

MECHANISMEN DER THROMBOZYTEN-AKTIVIERUNG

INDUZIERT DURCH VASOPRESSIN

vorgelegt von

Marianne Stifel

aus

Bisingen

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0124

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. E. Buchborn

MECHANISMEN DER THROMBOZYTEN-AKTIVIERUNG

INDUZIERT DURCH VASOPRESSIN

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Marianne Stifel

aus

Bisingen

1986

Mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. P.C. Weber
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. E. Buchborn Prof. Dr. W. Wilmanns
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. W. Siess
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	10. 06. 1986

Für Christian

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
I. EINLEITUNG	1
II. STAND DER FORSCHUNG	4
A Vasopressin	4
a) Struktur von Vasopressin	4
b) Synthese und axonaler Transport	6
c) Regulation der Vasopressinaus- schüttung	11
d) Wirkungen von Vasopressin	13
1 Antidiuretische Wirkung	13
2 Cardiovasculäre Wirkung	13
3 Wirkung auf Lernen und Gedächtnis	15
4 Metabolische und sonstige Wir- kungen	16
e) Vasopressin-Rezeptoren und second messenger	17
1 V_1 -Rezeptor	19
2 V_2 -Rezeptor	21
3 Zentraler Rezeptor	23
f) Vasopressin Analoge	23
B Phospholipid-Metabolismus und Thrombozytenaktivierung	25
a) Biochemie der Inositolphospholipide	25
b) Biochemie des thrombozytären Arachidonsäurestoffwechsels	34
c) Second messenger	36
d) Phospholipase C induzierte Inositol Phospholipid-Hydrolyse und Thrombo- zytenfunktion	38

III. FRAGESTELLUNG	41
IV. MATERIAL UND METHODIK	43
A Material	43
1 Fertige Substanzen	43
2 Lösungen und Puffer	44
3 Herstellung von HHT und 12-HETE	46
4 Präparation von Inositolphosphaten und Glycerophospho-Inositolphosphaten	46
B Methodik	49
1 Herstellung von PRP	49
2 Messung der Phospholipase C-Aktivie- rung und des Arachidonsäure-Stoff- wechsels in mit (^3H) Arachidonsäure prämarkierten Thrombozyten in Bezie- hung zur Thrombozytenfunktion	49
3 Messung der Inositolphosphate in mit (^3H) Inositol prämarkierten Thrombozyten in Beziehung zur Throm- bozytenfunktion	53
4 Auswertung der Ergebnisse	56
V. ERGEBNISSE	58
A Wirkungen von Vasopressin und DDAVP auf die Thrombozytenfunktion	58
1 Aggregation in Thrombozytenreichem Plasma	58
2 Aggregation in gewaschenen Thrombo- zyten	59

	<u>Seite</u>
3 Variabilität	61
B Wirkungen von Vasopressin auf die Phospholipase C-Aktivierung und den Arachidonsäure-Stoffwechsel	62
C Wirkungen von Vasopressin auf die Bil- dung von Inositolphosphaten	68
D Einfluß von thrombozytären Arachidon- säure-Metaboliten auf die Phospholipase C-Aktivierung und die Thrombozyten- aggregation induziert durch Vasopressin	76
E Einfluß von thrombozytär freigesetztem ADP	79
F Einfluß extrazellulärer zweiwertiger Kationen	83
G Einfluß von Rezeptor-Blockern. Vaso- pressin aktiviert in Thrombozyten den V ₁ -Rezeptor	85
VI. DISKUSSION	88
A Methodik	88
B Einfluß von Vasopressin auf den Inosi- tolphospholipid-Stoffwechsel, die Bil- dung von Diazylglyzerol, Phosphatid- säure und Inositolphosphaten	88
C Einfluß von thrombozytär gebildeten Arachidonsäure-Metaboliten, freigesetz- tem ADP und extrazellulären Kalzium- und Magnesium-Ionen.	91

	<u>Seite</u>
D Second messenger (Diazylglyzerol, Inositoltrisphosphat und Phosphatid- säure)	93
E Korrelation von Inositolphospholipid- Hydrolyse und Thrombozytenfunktion	96
F Rezeptorzuordnung	97
VII. ZUSAMMENFASSUNG	99
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	101

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Arachidonsäure
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adosintrisphosphat
CO	Zyklooxygenase
d(CH ₂) ₅ Tyr(Me) AVP	1-(β-mercapto-β, β-cyclopentamethylene- propionic acid 2-O-methyltyrosine 4- valine 8-D-arginine vasopressin
DDAVP	1-Desamino-8-D-arginin-Vasopressin
1,2-DG	1,2-Diazylglyzerol
GroPIIns	Glyzerophosphoinositol
Ins	Inositol
Ins 1-P	Inositol 1-monophosphat
Ins2-P	Inositol 2-monophosphat
Ins1,4-P ₂	Inositol 1,4-bisphosphat
Ins1,4,5- P ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphat
12-HETE	12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid
HHT	12-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid
HPLC	High Performance Liquid Chromato graphy
IP ₁	Inositol 1-monophosphat
IP ₂	Inositol 1,4-bisphosphat
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphat
LO	Lipoxygenase
PA	Phosphatidsäure

VI

PAF	Platelet activating factor
PI	Phosphatidylinositol
PIP ₁	Phosphatidylinositol-4-monophosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PRP	Plättchenreiches Plasma
PPP	Plättchenarmes Plasma
PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdIns4P	Phosphatidylinositol 4-monophosphat
PtdIns 4,5P ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TXB ₂	Thromboxan B ₂
TZ	Thrombozyten
VP	Vasopressin
Zyklisches AMP	Zyklisches Adenosin 3', 5'- monophosphat

I. EINLEITUNG

Das Hormon Vasopressin löst seine vasopressorische und antidiuretische Wirkung sehr wahrscheinlich über eine Aktivierung von zwei verschiedenen Rezeptoren, die als V_1 - und V_2 -Rezeptoren bezeichnet werden, aus (1).

Diese beiden Rezeptoren unterscheiden sich nicht nur strukturell, sondern nach neueren Untersuchungen auch in der Zuordnung zu verschiedenen second messenger Systemen (1,2).

Studien an Hepatozyten ergaben, daß eine Aktivierung von V_1 -Rezeptoren mit einer Hydrolyse von Inositolphospholipiden und einer Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium verbunden ist (3-11), während in Studien an renalen tubulären Zellen eine Aktivierung von V_2 -Rezeptoren zu einem Anstieg von zyklischem AMP führte (12).

Außer der Stimulation der Inositolphospholipid-Hydrolyse und der Adenylzyklase führt Vasopressin zusätzlich in einer Reihe von Zellen zu einer vermehrten Prostaglandinbildung (13-18).

In Thrombozyten führt Vasopressin sehr wahrscheinlich über eine Aktivierung von V_1 -Rezeptoren zu Aggregation und Freisetzungsreaktion (19, 20). In isolierten Thrombozytenmembranen konnte gezeigt werden, daß durch die Aktivierung von V_1 -Rezeptoren die Aktivierung der Adenylzyklase gehemmt wird, es jedoch in intakten

Thrombozyten zu keinem Abfall von zyklischem AMP kommt (21). Aufgrund dieser Beobachtung ist ein Abfall von zyklischem AMP als Ursache für die Aktivierung von Thrombozyten durch Vasopressin unwahrscheinlich.

Eine Reihe von verschiedenen Thrombozyten-Agonisten wie Thrombin, Kollagen, Platelet-activating Factor, Arachidonsäure, Prostaglandin Endoperoxid-Analoga und Dihomogammalinolensäure induzierten in Thrombozyten eine Hydrolyse von Inositolphospholipiden und intrazelluläre Kalzium-Mobilisierung (22-34).

Dabei konnte eine enge Korrelation zwischen Thrombozytenfunktionsänderungen und der Phospholipase C induzierten Inositolphospholipid-Hydrolyse beobachtet werden (26-29, 33, 34).

Nach dem heutigen Stand der Forschung werden folgende zwei second messenger, die aufgrund der hydrolytischen Spaltung von Inositolphospholipiden entstehen, vermutet:

1,2-Diacylglycerol aktiviert die Proteinkinase C (35) und Inositol 1,4,5-Trisphosphat mobilisiert Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum (36, 37).

Kürzlich konnte in einer Studie gezeigt werden, daß Vasopressin in Thrombozyten das zytosolische Kalzium erhöht, und zwar indem es Kalzium zum Teil aus intrazellulären Speichern freisetzt (38). Es lag daher nahe, den Einfluß von Vasopressin auf den Inositolphospho-

lipid-Stoffwechsel in Thrombozyten zu untersuchen.

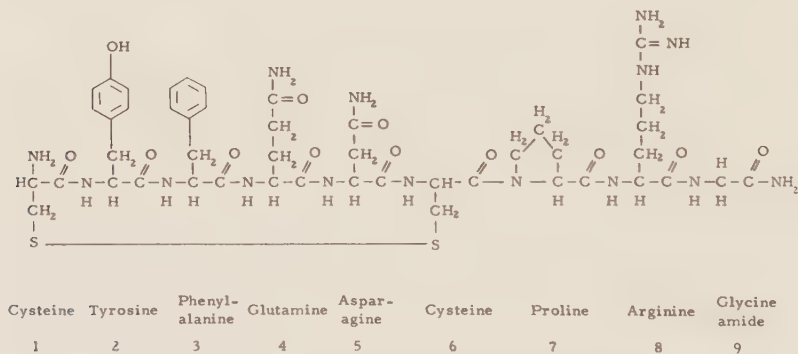
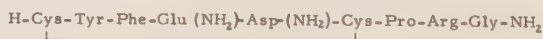
In der vorliegenden Arbeit wurde außer dem Einfluß von Vasopressin auf die Inositolphospholipide seine Wirkung auf die Freisetzung von Arachidonsäure und die Bildung von Arachidonsäure-Metaboliten in Beziehung zu physiologischen Thrombozytenantworten untersucht.

II. STAND DER FORSCHUNG

A VASOPRESSIN

a) Struktur von Vasopressin

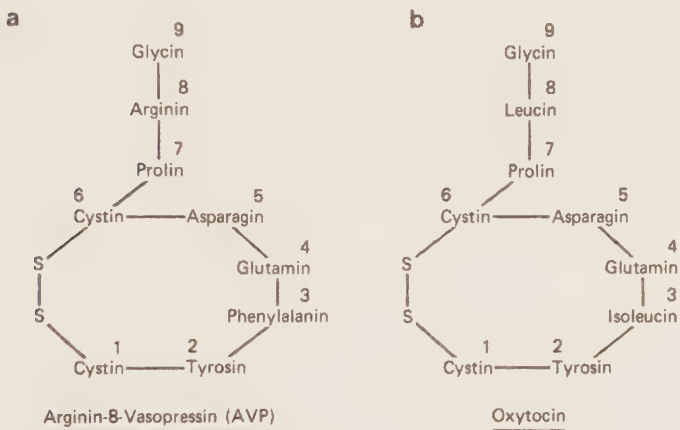
Vasopressin ist ein Nonapeptid, bei dem die Cysteinmoleküle in Position 1 und 6 über eine Disulfidbrücke verbunden sind (Abb. 1, 2). Die Strukturaufklärung und Synthese wurde 1953 von du Vigneaud und Mitarbeitern durchgeführt (39, 40).

FIG. 2. Arginine-vasopressin (Arg⁸-vasopressin).Abb. 1: Arginin-vasopressin (Arg⁸-vasopressin)

Man unterscheidet Arginin⁸ (Arg⁸)-Vasopressin und Lysin⁸ (Lys⁸)-Vasopressin (41). Arg⁸-Vasopressin kommt bei den meisten Wirbeltieren vor und wurde zuerst aus Hypophysen von Rindern isoliert. Die chemische Summenformel von Arg⁸-Vasopressin ist



sein Molekulargewicht beträgt 1083. Lys⁸-Vasopressin hat eine ähnliche Wirkungsweise wie Arg⁸-Vasopressin und wurde in Hypophysen von Schweinen gefunden (41)



Chemische Struktur von Arginin-Vasopressin und Oxytocin.

Abb. 2a: Arg⁸-Vasopressin

Abb. 2b: Oxytocin

Das Nonapeptid Oxytocin hat eine ähnliche Struktur wie Vasopressin, zeigt jedoch eine ganz andere Wirkung (Abb. 2, 3).

Oxytocin verursacht als Hormon eine Kontraktion der myoepithelialen Zellen der Mamma und bewirkt die Milchausstoßung in die Mamille.

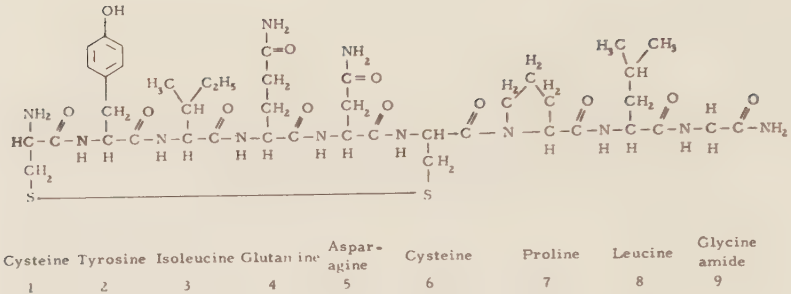


FIG. 1. Oxytocin.

Abb. 3: Oxytocin

b) Synthese und axonaler Transport

Die Kerne der Vasopressin-produzierenden Zellen liegen in den paarigen nuclei supraoptici und paraventriculares des Hypothalamus. Von beiden nuclei ziehen lange neurohypophysäre Axone zum Hypophysenhinterlappen.

Vasopressin wird als Teil eines Prohormons, des "Pro-Pressophysins" synthetisiert (Abb. 4).

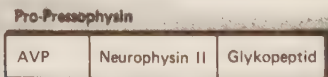


Abb. 4: Schematischer Aufbau der Hormonvorstufe Pro-Pressophysin

Mit Hilfe der Gentechnologie konnte die Struktur dieses Pro-Pressophysins, der Vorstufe des Vasopressins, aufgeklärt werden (42, 43). Das Prohormon umfaßt außer Arginin-Vasopressin (AVP) ein Trägerprotein (Neurophysin II) und ein Glykopeptid.

Vasopressin wird als Teil seines Prohormons im endoplasmatischen Retikulum von neurosekretorischen Neuronen des Hypothalamus gebildet und an den Golgiapparat abgegeben, in dem die Hormone in membranumschlossene Granula eingebaut werden. Diese Granula wandern in den Axonen zum Nervenende im Hypophysenhinterlappen (axoplasmatischer Transport = Transport vom Zellleib zum Ende des Axons).

Während dieses Transportes wird Vasopressin vom Prohormon abgespalten (Abb. 5).

Vasopressin sezernierende Zellen sind nicht nur im Hypothalamus, sondern auch in geringer Zahl in anderen Hirnarealen gefunden worden, so zum Beispiel im Vagus Kern und in der Medulla oblongata. Die ursprünglich als rein neurohypophysär angesehenen Peptide im ZNS haben wohl noch als Neurotransmitter oder Neuromodulator eine lokale Wirkung (44, 45).

Im sympathischen Nervensystem wurde ebenfalls kürzlich ein bioaktives Peptid, ein "Vasopressin-like peptide" gefunden, und zwar sowohl in postganglionären sympathischen Neuronen als auch in peripheren, sympathischen Nervenfasern. Das vasopressin-like peptide könnte auf eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems hin freigesetzt werden und als möglicher Mediator einer nicht adrenergen Antwort fungieren (46).

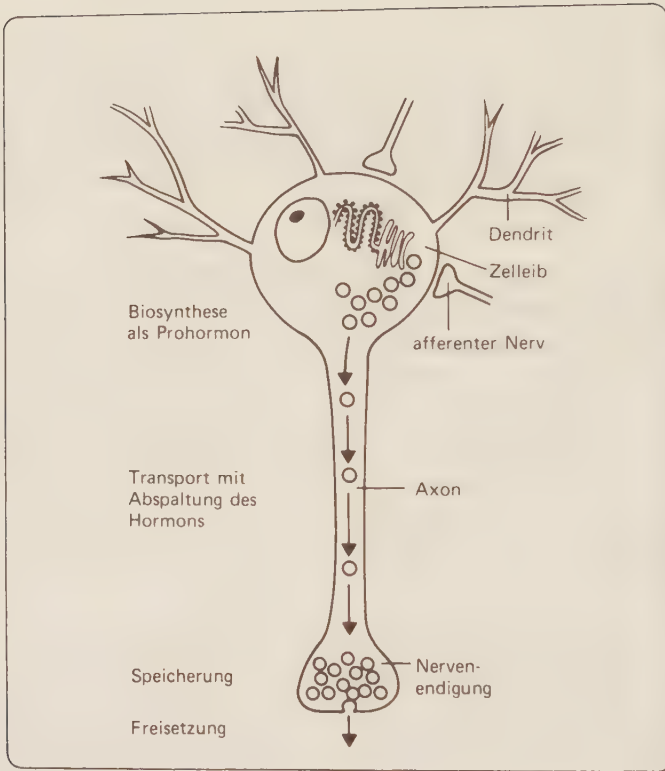


Abb. 5: Schematische Darstellung von Synthese, neuronalem Transport, Speicherung und Freisetzung der neurohypophysären Hormone

Im Hypophysenhinterlappen erfolgt die Freisetzung von Vasopressin aus den Granula nach Erregung der Nervenendigung, die mit einem längs des Neuriten fortgeleiteten Aktionspotential einhergeht. Dabei wird der Inhalt der Granula bei Depolarisation der Nervenendi-

gung durch Exozytose freigesetzt und in Kapillaren sezerniert. Über die Vena hypophyseos inferior gelangt Vasopressin schließlich in den peripheren Kreislauf (47) (Abb. 6).

Neben den langen neurohypophysären Axonen, die in den Hypophysenhinterlappen ziehen, gibt es noch kurze Neurone vom paraventriculären Nucleus zur Eminentia mediana, an der Basis des Hypothalamus. Dort werden die Hormone in fenestrierte Kapillaren aufgenommen und haben dann sowohl Zugang zum Pfortaderkreislauf der Hypophyse, als auch zur peripheren Blutbahn (Abb.6).

Diese Verbindung der Vasopressin-Zellen erklärt, warum es nach einer Hypophysenstieltrennung im allgemeinen nicht zu einem permanenten Vasopressinmangel mit Diabetes insipidus kommt. Die kurzen Bahnen sind vor der Degeneration geschützt, wenn die Eminentia mediana unbeschädigt bleibt (41).

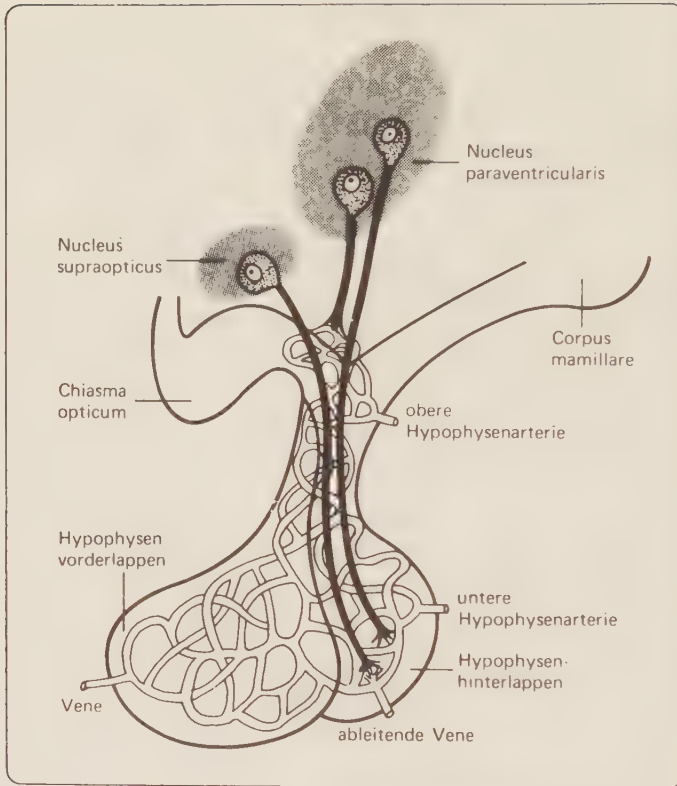


Abb. 6: Schematische Darstellung der neurohypophysären Verbindungswege: (Ref. 41)

Die Kerne der vasopressin- und oxytocin-produzierenden Zellen liegen im supraoptischen und paraventriculären Nucleus des Hypothalamus. Lange neurohypophysäre Axone ziehen von beiden Nuclei zum Hypophysenhinterlappen, wo die Hormone auf entsprechende Reize hin in die periphere Blutbahn ausgeschüttet werden.

Kurze Neurone ziehen vom paraventriculären Nucleus zur Eminentia mediana, die über das Pfortadersystem der Hypophyse Anschluß zur Körperperipherie hat.

c) Regulation der Vasopressinausschüttung
(siehe Tabelle 1)

Die Vasopressin-Ausschüttung wird durch Erregung von Osmorezeptoren im Gebiet der A. carotis interna und im Hypothalamus stimuliert. Wenn Wasserverluste des Körpers nicht oder nicht genügend ersetzt werden, wird das Blutplasma hyperton ($> 290 \text{ mosm/l}$). Ein Anstieg um nur 3 mosm/l genügt, um die Vasopressin-Ausschüttung im Hypophysenhinterlappen zu erhöhen.

Der gleichzeitig auftretende Durst stimuliert über das sog. "Durstzentrum" im Hypothalamus die Vasopressin-Ausschüttung, was zur renalen Wasserretention führt. Reize, die den Durst hemmen, setzen auch die Vasopressin-Freisetzung und damit die Wasserausscheidung herab. Die physiologische Grundlage besteht in einer engen anatomischen und funktionellen Kopplung des hypothalamischen "Durstzentrums" mit den vasopressin-produzierenden Kerngebieten im Hypothalamus.

Wasserüberschuß vermindert die Plasmaosmolarität, was zu einer Hemmung der Vasopressinausschüttung führt.

Ein vermindertes Plasmavolumen führt dazu, daß der Druck im Niederdrucksystem des Kreislaufs abfällt, was über Dehnungsrezeptoren im linken Herzvorhof neural direkt zum Hypothalamus gemeldet wird und so eine Vasopressinausschüttung bewirkt (Henry-Gauer-Reflex).

Weiterhin gibt es noch andere Reize für die Vasopressin-Ausschüttung, die in Tabelle 1 aufgeführt sind.

Tabelle 1: Stimulation und Hemmung der Vaso-
pressinausschüttung

Stimulation

Hyperosmolarität extrazellulärer
Flüssigkeit ($> 290 \text{ mosm/l}$)
(Signal über Osmorezeptoren
im Gebiet der A. carotis
int. und im Hypothalamus)

Hypovolämie
(Signal über Rezeptoren im
linken Vorhof des Herzens und
den großen Pulmonalvenen)

Hypoglykämie

Durst

Stimulation des Renin-Angio-
tensin-Systems

Medikamente
(z.B.: Barbiturate, Choliner-
gika, Morphin)

Nikotin

Hemmung

Hypoosmolarität extrazellulärer
Flüssigkeit ($< 290 \text{ mosm/l}$)

Hypervolämie
(zum Beispiel bei Links-
insuffizienz)

Hyperglykämie

Medikamente
(z.B.: Diphenylhydantoin,
Atropin)

Alkohol

d) Wirkungen von Vasopressin

1) Antidiuretische Wirkung

Vasopressin (= antidiuretisches Hormon, ADH) hat eine zentrale Bedeutung für die physiologische Regulation des Wasserhaushaltes. Es erhöht die Permeabilität des distalen Tubulus und der Sammelrohre für Wasser und steigert damit die Wasserrückresorption.

Ein Ausfall der Vasopressin-Bildung, zum Beispiel aufgrund von Hypophysentumoren, führt zum zentralen Diabetes insipidus. Eine Mehrproduktion von Vasopressin, zum Beispiel in Tumormetastasen (paraneoplastisch) ist mit dem Syndrom der inadäquaten ADH (Vasopressin)-Sekretion verbunden, bei dem meist Ödeme auftreten.

2) Cardiovasculäre Wirkung

Vasopressin wirkt kontrahierend auf die glatte Gefäßmuskulatur einer Reihe regionaler Arterien bzw. Arteriolen (Arterien des Splanchnikusgebietes, der Nieren, der Skelettmuskulatur und der Leber) (48). Vasopressin zeigt in pharmakologischen Dosen bei in vitro-Versuchen eine starke vasokonstriktorische Wirkung (48). Da diese vasopressorisch wirksamen Konzentrationen im Blut normalerweise nicht erreicht werden, wird diese Wirkung bisher als physiologisch relativ unwichtig angesehen.

Bei Säugetieren beträgt die Plasmakonzentration von

Vasopressin bei normalem Blutvolumen und normaler Blutosmolarität ungefähr 3 pg/ml ($\approx 2,76 \times 10^{-12}$ M).

Bei Zunahme der Plasmaosmolarität werden Plasmakonzentrationen von 20 pg/ml ($\approx 18,4 \times 10^{-12}$ M) gemessen, während bei starken Blutverlusten Werte von über 500 pg/ml ($\approx 460 \times 10^{-12}$ M) gefunden werden (49). Wahrscheinlich spielt Vasopressin bei der essentiellen Hypertonie für die Erhaltung von hohen Blutdruckwerten keine bedeutende Rolle (50).

Bei Plasmakonzentrationen unter 20 pg/ml findet man keine Blutdruckänderung bei intakten Organismen, die Messung des Herzminutenvolumens zeigt jedoch einen klaren Anstieg des peripheren Gesamtwiderstandes (51).

Studien an Brattleboro-Ratten zeigten Vasopressin als bedeutenden Faktor in der Blutdruck-Regulation nach Hämorrhagie (52, 53).

Vasopressin bewirkt in Konzentrationen, die einen renalen, antidiuretischen Effekt zeigen, eine Vasokonstriktion. Der vasokonstriktorische Vasopressin-Effekt führt jedoch nicht zu einem Blutdruckanstieg. Diesen erhält man erst bei relativ hohen Plasmakonzentrationen. Hierfür scheint die starke Pufferwirkung durch den Barorezeptor-Effekt verantwortlich zu sein.

Crofton & Share sehen Vasopressin jedoch als pathogenetischen Faktor bei einigen Formen der experimentellen Hypertonie (54, 55). Vasopressin könnte aber auch über eine zentrale Wirkung an der kardiovaskulären Regulation teilhaben. Basis dieser Hypothese sind

vasopressinerge Neurone, die von dem Hypothalamus zu Zentren in der Medulla oblongata verlaufen, die mit der Blutdruckregulation gekoppelt sind (= "neurale Blutdruckkontrolle von Vasopressin") (56, 57).

Das sogenannte vasopressin-like peptide (VLP), welches durch sympathische Erregung freigesetzt werden kann, könnte ebenfalls durch lokale vasokonstriktorische Wirkung eine Rolle spielen. Diese periphere Freisetzung von vasopressin-like peptide könnte erklären, warum eine Reihe von Geweben nur bei Konzentrationen höher als sie normalerweise durch Sekretion in den Blutstrom erreicht werden, Antworten auf Arginin-Vasopressin geben (46).

Vasopressin ist sicherlich an einer kurzfristigen Blutdruck-Kontrolle in Situationen wie zum Beispiel Hämorrhagie und Dehydratation beteiligt. Vasopressin ist hierbei jedoch nur einer von mehreren, kurzfristigen Mechanismen, die gegen einen Blutdruckabfall wirken.

3) Wirkung auf Lernen und Gedächtnis

In Tiermodellen wurde gezeigt, daß Vasopressin neben verschiedenen anderen Neuropeptiden Lernen und

Gedächtnis beeinflusst. Nach Injektion von spezifischen Vasopressin-Antiseren sind Lern- und Gedächtnisleistungen beeinträchtigt, und dieser Effekt kann durch Gabe von Vasopressin oder seiner Analoga behoben werden (58, 59).

Diese neuen Erkenntnisse haben bereits zur klinischen Anwendung von Vasopressin und Vasopressin-Analoga geführt:

Das Hormon bessert die retrograde traumatische Amnesie (60) und es ist außerdem bei endogenen Depressionen erfolgreich eingesetzt worden (61). Auch die Gedächtnisleistungen von Patienten mit zentralem Diabetes insipidus können günstig beeinflußt werden (62).

4) Metabolische und sonstige Wirkungen

Vasopressin hat verschiedene metabolische Wirkungen auf die Hepatozyten, es wirkt sowohl auf den Fettsäure- als auch auf den Kohlehydratstoffwechsel. Vasopressin erhöht einerseits den Einbau von Fettsäuren in Lipide und andererseits deren Oxidation zu Kohlendioxid, es vermindert die Ketonkörperbildung (63).

Es stimuliert die Gluconeogenese und verhindert die Glykogensynthese (64). Vasopressin stimuliert über die Aktivierung der Glykogenphosphorylase die Glykogenolyse (63). Es bewirkt eine allosterische Aktivierung der Phosphorylase-Kinase, woraufhin die Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase erfolgt (64, 65). Zykli-

sches AMP scheint bei dieser Stoffwechselregulation keine Rolle zu spielen.

Es scheint eher, daß die metabolischen Vasopressin-Antworten in der Leber direkt aus der Kalzium-Mobilisierung und damit einer Erhöhung von zytosolischem Kalzium resultieren (11). Die Erhöhung des zytosolischen Kalziums ist wahrscheinlich eine Folge der durch Vasopressin induzierten Stimulation der Inositol-Phospholipidhydrolyse (3-11).

Vasopressin hemmt über eine Aktivierung von V_1 -Rezeptoren direkt die Adenylzyklase in Hepatozyten (66) und erhöht über eine Aktivierung von V_1 -Rezeptoren das zytosolische Kalzium (67). Möglicherweise besitzt Vasopressin zu diesem Rezeptor, der mit der Adenylzyklase gekoppelt ist, sogar eine höhere Affinität als zu dem, der mit der Kalziummobilisierung verknüpft ist (67).

e) Vasopressin-Rezeptoren und second messenger

Mitchell und Mitarbeiter vermuteten die Existenz von zwei verschiedenen Vasopressinrezeptoren, die sie als V_1 - und V_2 -Rezeptoren bezeichneten (1). Durch die V_1 -Rezeptoren wird der vasopressorische Effekt, durch V_2 -Rezeptoren die antidiuretische Wirkung vermittelt.

Die Rezeptoren unterscheiden sich nicht nur in ihrer funktionellen Eigenschaft, sondern auch strukturell: V_1 - und V_2 -Rezeptoren haben ein unterschiedliches

Molekulargewicht (V_1 -Rezeptor in der Rattenleber: 76 ± 8 kDa, V_2 -Rezeptor in der Rinderniere: 108 ± 11 kDa) (2).

Sie sind als Produkte verschiedener Gene anzusehen (2). Durch die Verfügbarkeit von spezifischen Vasopressin-Agonisten und -Antagonisten konnte die Verteilung von V_1 - und V_2 -Rezeptoren in verschiedenen Geweben während der letzten Jahre weiter aufgeklärt werden.

Stimulation von V_1 -Rezeptoren ist mit einer Hydrolyse von Inositolphospholipiden und intrazellulärer Kalzium-Mobilisierung verbunden, während V_2 -Rezeptorstimulation einen Anstieg von zyklischem AMP bewirkt.

Sowohl V_1 - als auch V_2 -Rezeptoraktivierung kann eine Stimulation der Prostaglandinbildung verursachen. Vasopressin ruft eine solche Stimulation in verschiedenen Zellkulturen hervor: In glomerulären Mesangial- und Epithelzellen (15, 16), renomedullären Interstitialzellen (17, 69), in Fibroblasten (18), in renokortikalen Sammelrohren (73), sowie in Hepatozyten (14) und in glatten Gefäßmuskelzellen (13).

Der limitierende Schritt für die Prostaglandinsynthese ist die frei verfügbare Arachidonsäure. Vasopressin bewirkt die Arachidonsäurefreisetzung aus Phospholipiden möglicherweise über zwei Mechanismen: Einerseits durch Aktivierung von Phospholipase C und Diacylglyceridlipase und andererseits durch Aktivierung von Phospholipase A_2 .

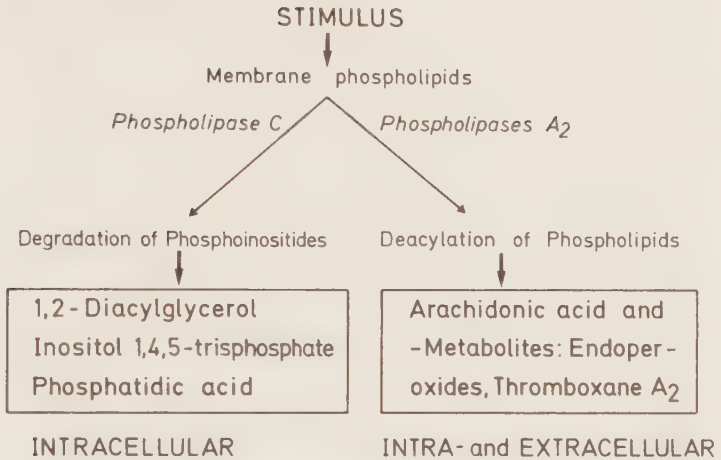


Abb. 7: Degradation von Phospholipiden in der Zellmembran durch einen Stimulus mit Bildung von aktiven Metaboliten.

1) V_1 -Rezeptor:

Die Kopplung von V_1 -Rezeptoren-Aktivierung zur Zellantwort ist am besten an isolierten Hepatozyten von Ratten untersucht worden (68). Es zeigte sich eine Korrelation zwischen der Potenz von verschiedenen Vasopressin-Analogen, die Glykogenolyse zu stimulieren, und deren vasopressorischem Effekt (68).

V_1 -Rezeptor-Aktivierung in Hepatozyten führt zu einer Phospholipase C induzierten Hydrolyse von Inositol-phospholipiden und zu intrazellulärer Ca^{++} -Mobilisierung (3-11).

Nach neueren Untersuchungen wird Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat direkt durch Phospholipase C abgebaut. Das hierbei entstehende Inositol-trisphosphat ist für die Kalzium-Mobilisierung direkt verantwortlich. Werden Hepatozyten mit Vasopressin stimuliert, so gehen Inositol-trisphosphat und Kalzium-Mobilisierung zeitlich der Glykogenphosphorylase-Aktivierung voraus (10,11). Es scheint sehr wahrscheinlich, daß Inositoltrisphosphat ein second messenger ist (36, 37).

Außer in Hepatozyten konnten V_1 -Rezeptoren noch in glatten Gefäßmuskelzellen gefunden werden: Vasopressin stimuliert in Kulturen von glatten Gefäßmuskelzellen die Prostaglandinsynthese über V_1 -Rezeptoren (13). Untersuchungen an isolierten Blutgefäßen, in situ Studien der Mikrozirkulation und vor allem Blutdruckuntersuchungen an Ratten zeigten einen vasokonstriktorisches Effekt von Vasopressin (18).

Da Vasopressin auf Arterien und Arteriolen verschiedener Organe innerhalb eines einzigen Gefäßsystems

unterschiedliche Wirkungen zeigt, werden Subtypen des V_1 -Rezeptors vermutet (48).

In folgenden Zellen wird die Wirkung von Vasopressin wahrscheinlich über eine Aktivierung von V_1 -Rezeptoren vermittelt:

In Zellkulturen von glomerulären Mesangialzellen stimuliert Vasopressin über V_1 -Rezeptoren die Bildung von Prostazyklin und Prostaglandin E_2 (PGE_2), welche der kontraktile Wirkung von Vasopressin auf die Mesangialzellen entgegenwirken dürften (15).

Die Vasopressinwirkung scheint hier von der zellulären Kalzium-Aufnahme über Kalzium-Kanäle abhängig zu sein.

Weiterhin erhöht Vasopressin in Kulturen von renomedullären Interstitialzellen über V_1 -Rezeptoren die Bildung von Prostaglandin E_2 . Es stimuliert auch die zelluläre Kalzium-Aufnahme, wodurch es zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums und der Aktivierung der Kalzium/Calmodulin abhängigen Phospholipase A_2 kommt, die die Arachidonsäure-Freisetzung bewirkt (17, 69).

2) V_2 -Rezeptor:

V_2 -Rezeptoren in der Niere sind in den Epithelien des distalen Tubulus lokalisiert. Über V_2 -Rezeptoren-Stimulation wird die antidiuretische Wirkung von Vasopressin vermittelt. Vasopressin führt über die

Aktivierung einer membrangebundenen Adenylzyklase zu einem Anstieg von zyklischem Adenosin 3', 5'-monophosphat (zyklisches AMP) (12). Die Vorgänge nach der Adenylzyklase-Aktivierung sind noch nicht genau bekannt. Eventuell aktiviert zyklisches AMP eine Kinasase, die Membranproteine phosphoryliert (70).

In Untersuchungen wurde beobachtet, daß Vasopressin eine Aggregation von membrangebundenen Partikeln auslöst, wodurch die Kanäle für den Wasserdurchtritt vergrößert werden (71).

Zyklisches AMP stimuliert möglicherweise die Bildung von Mikrotubuli oder Mikrofilamenten und ändert dadurch die Zellmembranstruktur, was zu einer Erhöhung der Wasserdurchlässigkeit führt (72).

In renalen Sammelrohr-Epithelzellen wird nach Vasopressin-Stimulation die Synthese von Prostaglandinen erhöht (73). Das Prostaglandin PGE_1 erhöht durch direkten Einfluß auf die Zellmembran deren Wasserpermeabilität, es vermindert die Vasopressineffekte, zeigt jedoch keinen Einfluß auf das zyklische AMP (74).

Zwischen Vasopressin und PGE_1 konnte ein Antagonismus beobachtet werden (75). PGE_1 wirkt möglicherweise als kritischer Modulator für den hydroosmotischen Vasopressin-Effekt und verhindert so große Variationen der Wasserpermeabilität des Nephrons.

Untersuchungen am Nierenmark zeigten, daß verschiedene Prostaglandine wie Vasopressin die zyklische AMP-Produktion stimulieren können.

3) Zentraler Rezeptor

Dieser Rezeptor kann wahrscheinlich weder V_1 noch V_2 zugeordnet werden (76), obwohl er von V_1 -Rezeptor-Antagonisten blockiert werden kann. Dieser Rezeptor spielt bei Erinnerungs- und Lernvorgängen und beim Kurzzeitgedächtnis eine Rolle (77, 78).

f) Vasopressin Analoge

Vasopressin Analoge können als Agonisten oder als Antagonisten auf den V_1 - bzw. V_2 -Rezeptor wirken: Abb. 2

	V_1 -Rezeptor -Agonist	V_2 -Rezeptor -Agonist	V_1 -Rezeptor -Antagonist	V_2 -Rezeptor -Antagonist
Lys ⁸ -Vasopressin	++	++	-	-
Arg ⁸ -Vasopressin	++	++	-	-
DDAVP (1-Desamino-8 D-Arginin- Vasopressin)	(+)	++	(+)	-
d(CH ₂) ₅ Ty (Me) VDAVP	-	(+)	++	-

Manning und Sawyer entwickelten V_1 -Rezeptor-Antagonisten, die die Blutdruckwirkung, nicht aber die antidiuretische Wirkung von Vasopressin blockieren (79). Durch Änderungen in der Molekül-Struktur von Vasopressin können weniger vasokonstriktorisch wirkende Peptide als das natürlich vorkommende Vasopressin synthetisiert werden.

Eine Aminogruppe in L-Konfiguration in Position 8 und das Vorhandensein der N-terminalen Aminogruppe in Position 1 (siehe Abbildung 1) sind entscheidend für die Aktivierung des V_1 -Rezeptors, nicht jedoch des V_2 -Rezeptors.

Ersetzt man zum Beispiel L-Arginin durch D-Arginin in Position 8 des Vasopressins, so geht die V_1 -Rezeptor-aktivierende Wirkung verloren, und man erhält einen relativ schwachen V_1 -Rezeptor-Antagonisten. Bei dem selektiven antidiuretischen V_2 -Rezeptor-Agonisten, 1-Desamino-8-D-arginin-vasopressin (DDAVP, Minirin^R) fehlt zusätzlich die N-terminale Aminogruppe in Position 1.

DDAVP kann aufgrund seiner antidiuretischen Wirkung und der praktisch fehlenden vasopressorischen Wirkungskomponente (ca. 0,01 % der des natürlichen Vasopressins) bei der Behandlung des Diabetes insipidus klinisch angewendet werden. Enthält das Analogon eine Cyclopentamethylenpropionsäuregruppe in Position 1, so wirkt es als potenter V_1 -Rezeptor Antagonist. Als Beispiel hierfür sei die "Manning compound" angeführt, 1-(β -mercapto- β , β -cyclopentamethylenepropionic acid 2-O-methyltyrosine 4-valine 8-D-arginine vasopressin ($d(CH_2)_5Tyr(Me)VDAVP$) (20, 79).

Bis heute gibt es noch keine absolut spezifischen Agonisten bzw. Antagonisten. Spezifische Antagonisten könnten für die Unterscheidung, ob Vasopressin über V_1 - oder V_2 -Rezeptoren wirkt, von Bedeutung sein.

Auch klinisch wäre eine Spezifität sehr wichtig. Ein blutdrucksenkender (V_1)-Antagonist sollte keinen Diabetes insipidus auslösen. Ebenso sollte ein antidiuretischer (V_2)-Agonist keine vasopressorische Wirkung zeigen.

B PHOSPHOLIPID-METABOLISMUS UND THROMBOZYTEN-AKTIVIERUNG

a) Biochemie der Inositol Phospholipide

Die Phospholipide werden in verschiedene Hauptklassen eingeteilt, wobei für unsere Betrachtungen die vier folgenden Phospholipidklassen wichtig sind:

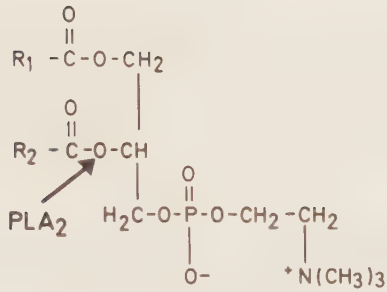
Phosphatidyl-Cholin, - Ethanolamin, - Inositol, - Serin (Abb. 8).

Der Anteil an Inositolphospholipiden beträgt ca. 5-8 % des Gesamtpospholipidgehaltes in Thrombozyten (80). Es gibt drei verschiedene Inositol-Phospholipide:

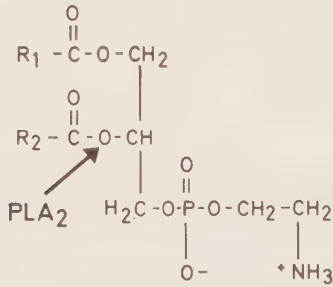
- Phosphatidylinositol (PtdIns),
- Phosphatidylinositol 4-monophosphat
(PtdIns4P)
- Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
(PtdIns4,5P₂).

Der Gehalt von PtdIns4P und PtdIns 4,5P₂ in zellulären Membranen entspricht ca. 15 % und 5 % dem von PtdIns (81).

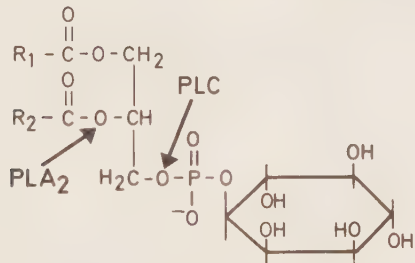
PtdIns4P und PtdIns4,5P₂ sind die polarsten unter den Phospholipiden, sie sind vor allem an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert (80).



Phosphatidyl Choline



Phosphatidyl Ethanolamine



Phosphatidyl Inositol

Abb. 8: Phospholipid-Subklassen

Die Inositolphospholipide enthalten zu $\sim 40 - 50\%$ Arachidsäure in Position 2 und $\sim 30 - 50\%$ Stearinsäure in Position 1 des Glyzerols (81). Eine Phosphodiesterbindung in Position 3 (siehe Abb. 8) verbindet Diazylglyzerol mit Inositol.

Phosphorylierung von PtdIns in Position 4 am Inositolring durch eine PtdIns-Kinase (Reaktion a) führt zu PtdIns 4P, und eine Phosphorylierung dieses Lipids an Position 5 durch eine PtdIns4P-Kinase (Reaktion b) zu PtdIns 4,5P₂ (Abb.9a). Spezifische Phosphomonoesterasen können diese Phosphatgruppen wieder abspalten (Reaktionen c und d).

Kinasen und Phosphomonoesterasen halten ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den drei Lipiden, sie gehören zu den aktivsten Zellenzymen. Für die Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichtes wendet die Zelle viel ATP auf. Man spricht deshalb auch von einem "futile cycle".

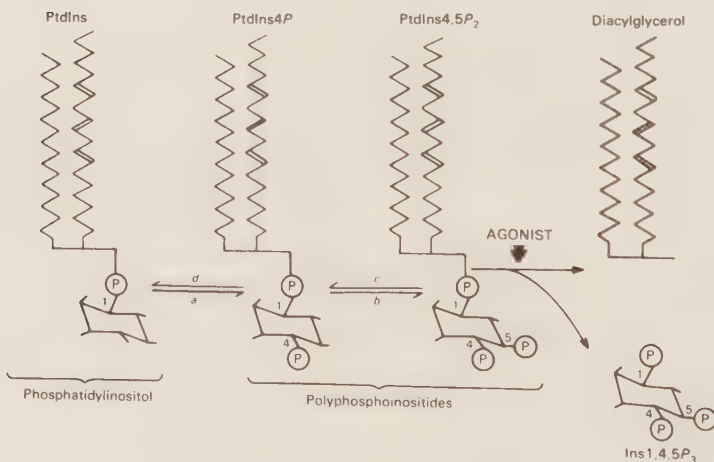


Abb. 9 a

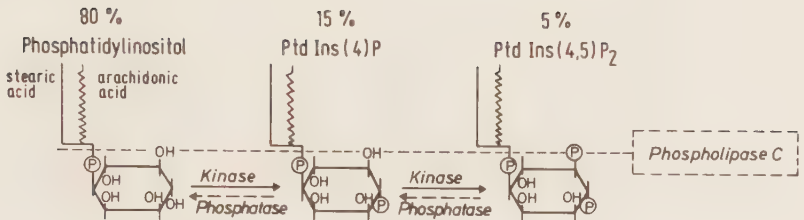


Abb. 9b

Bindet ein Agonist sich an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche, so wird eine Phospholipase C (PLC), die Inositolphospholipide abbaut, aktiviert.

Phospholipase C ist spezifisch für Inositolphospholipide, andere Phospholipide werden nicht angegriffen (Abb. 8). Die Messung von Inositolphosphaten gibt Auskunft darüber, welche Inositolphospholipide durch die Phospholipase C hydrolysiert werden (Abb. 9a, 10 und Tabelle 3).

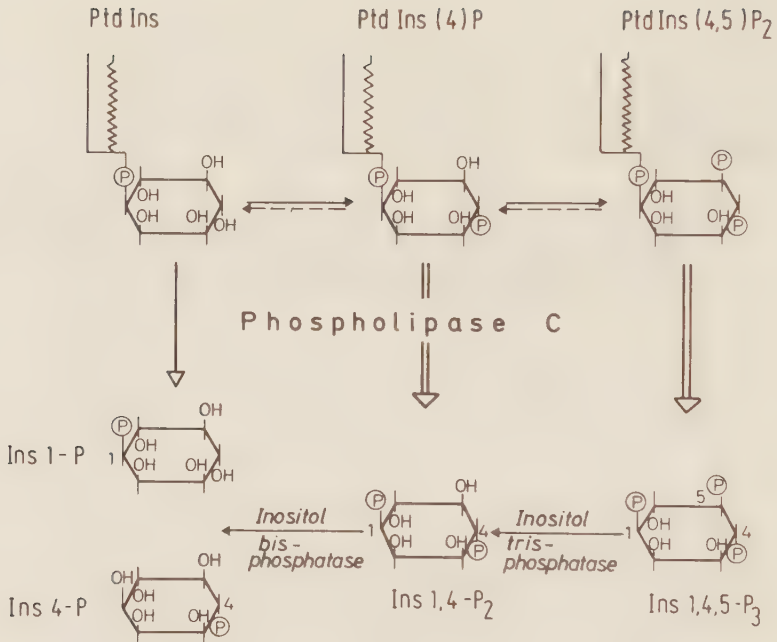


Abb. 10: Abbau der Inositol-Phospholipide durch Aktivierung von Phospholipase C

Durch Aktivierung der Phospholipase C entstehen verschiedene Inositolphosphate. Aus Phosphatidylinositol entsteht ein Inositol 1-Monophosphat, aus Phosphatidylinositol 4-Phosphat entsteht ein Inositol 1,4-Bisphosphat und aus Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat entsteht ein Inositol 1,4,5-Trisphosphat.

Tabelle 3

Phospholipase C

Phosphatidylinositol $\longrightarrow$ Inositol 1-monophosphat (IP_1)
(PI) + Diazylglyzerol

Phosphatidylinositol- $\longrightarrow$ Inositol 1,4-bisphosphat (IP_2)
4-monophosphat (PIP_1) + Diazylglyzerol

Phosphatidylinositol $\longrightarrow$ Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP_3)
4,5-bisphosphat (PIP_2) + Diazylglyzerol

Durch Aktivierung der Phospholipase C entstehen Diazylglyzerol (1,2-DG) und verschiedene Inositolphosphate (Tabelle 3, Abbildung 9b und 11)

Phospholipase C (Phosphodiesterase) ist im Zytosol lokalisiert. Durch Bindung des Agonisten an seinen Rezeptor werden die Inositolphospholipide der Phospholipase C auf unbekannte Weise "erkennbar" gemacht (82).

1,2-DG wird durch eine spezifische Kinase zu Phosphatidsäure weiter phosphoryliert (Abb. 12) oder kann durch eine Diazylglyzerid-Lipase gespalten werden. Dadurch kann Arachidonsäure freigesetzt werden.

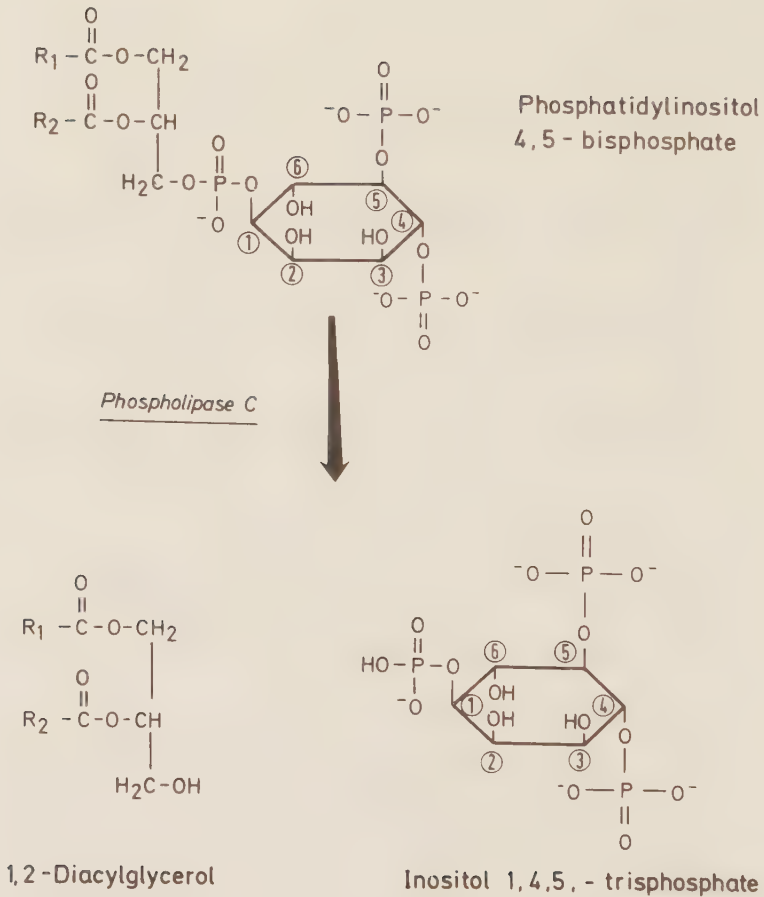


Abb. 11: Entstehung von 1,2-Diacylglycerol und Inositol 1,4,5-Trisphosphat durch Aktivierung der Phospholipase C

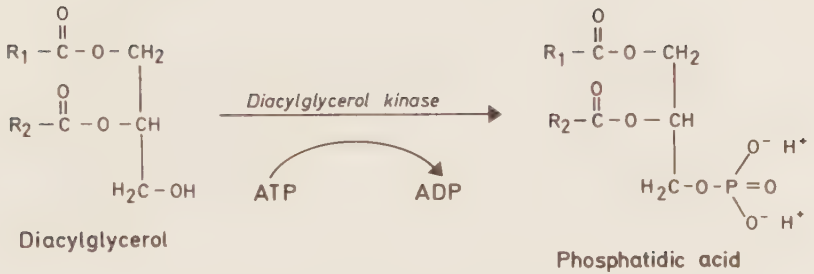


Abb. 12

Phosphatidsäure wird über CMP-Phosphatidsäure zur Resynthese von PtdIns verwendet, wodurch ein geschlossener Zyklus, der sog. "Phosphatidyl-Inositol-Zyklus" entsteht (Abb. 13).

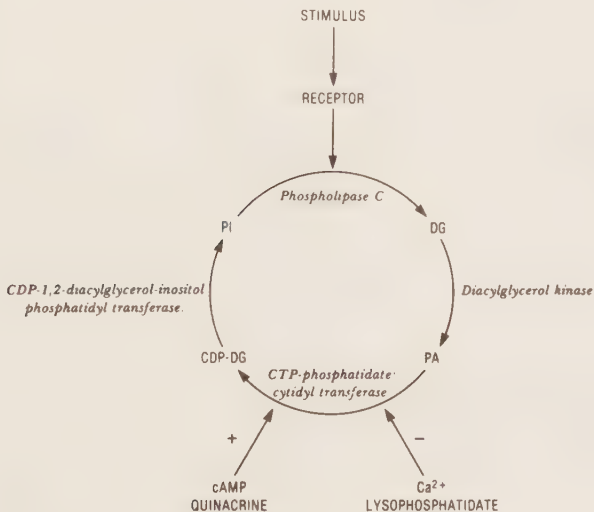


Abb. 13 (83): Regulation des Phosphatidylinositol-Zyklus durch cAMP und Kalzium.

b) Biochemie des thrombozytären Arachidonsäurestoffwechsels

Arachidonsäure kann sowohl aus Inositolphospholipiden durch Aktivität der Phospholipase C und Diazylglyzerid-Lipase gebildet werden, als auch aus Phosphatidylcholin, -äthanolamin oder -inositol durch Aktivität der Phospholipase A₂.

Hierbei ist der erstgenannte Stoffwechselweg noch nicht ganz gesichert.

Die gebildete Arachidonsäure kann durch die beiden Enzyme Lipoxygenase und Cyclooxygenase zu Eicosanoiden weiter abgebaut werden.

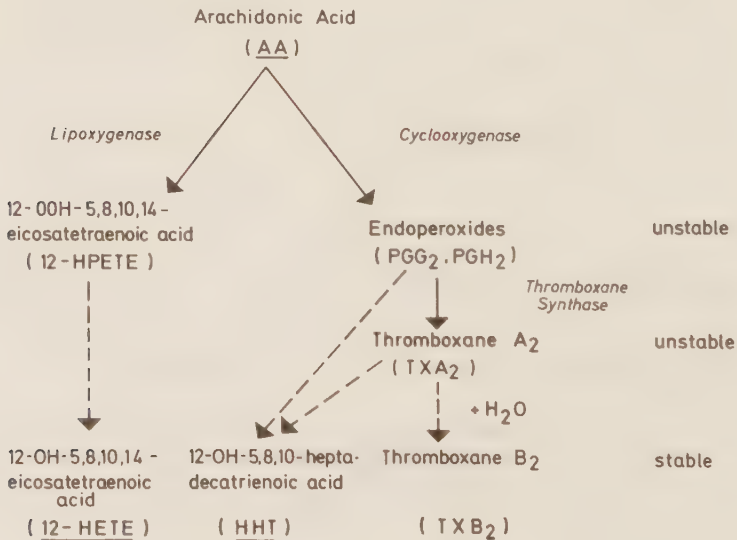


Abb. 14:

Durch die Aktivität der Zyklooxygenase entstehen die instabilen Endoperoxide PGG_2 und PGH_2 (84), diese werden weiter umgesetzt zu TXA_2 (85). Die stabilen Endprodukte der Endoperoxide und des TXA_2 sind HHT bzw. TXB_2 . Die Lipoxygenase bildet 12-HETE (84). Endoperoxide und TXA_2 aktivieren Thrombozyten (84, 85), Lipoxygenase-Produkte wirken wahrscheinlich inhibitorisch (86).

c) Second messenger

In einer großen Zahl von Zellen (einschließlich Thrombozyten) ist die Hormon-induzierte Hydrolyse von Inositolphospholipiden durch Phospholipase C sehr eng mit der Mobilisierung von Kalzium aus intrazellulären Speichern gekoppelt (87).

Neue Untersuchungen zeigen, daß Inositol 1,4,5-trisphosphat wahrscheinlich der second messenger ist, der nach Rezeptoraktivierung die Kalzium-Mobilisierung in einer Reihe von Zellen verursacht (36, 37, 88).

Inositol-trisphosphat ist wasserlöslich, im Zytosol freibeweglich und kann daher Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum mobilisieren, möglicherweise indem es sich dort selbst an spezifische Rezeptoren bindet (89).

Außer Inositol 1,4,5-trisphosphat hat 1,2-Diazylglyzerol eine Bedeutung als second messenger (Abb. 15). Es aktiviert eine spezifische Proteinkinase, die sogenannte Proteinkinase C (35). Proteinkinase C-Aktivierung bewirkt die Phosphorylierung eines 40 K Dalton Proteins, dessen Funktion noch ungeklärt ist.

Kalzium-Mobilisierung und Proteinkinase C-Aktivierung wirken synergistisch für die Zellantwort. So konnte in Thrombozyten gezeigt werden, daß exogene Zugabe von niedrigen Konzentrationen von Diazylglyzerol und Kalzium-Ionophor A23187, die per se die Zelle nicht aktivieren, Thrombozyten-shape change, Aggregation und Freisetzungsreaktion induzieren (90).

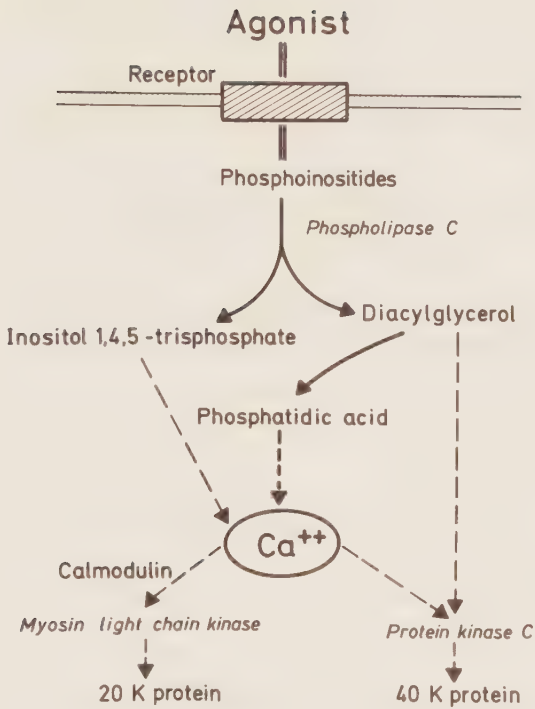


Abb. 15: Inositol-Phospholipid Degradation als auslösender Mechanismus für die Aktivierung von Proteinkinasen.

Als weiterer Second messenger könnte die Phosphatidsäure in Frage kommen. Sie ist membranständig und könnte über eine Änderung der Membraneigenschaften entweder direkt die Membranfusion von Kalzium begünstigen (91) oder die Kalzium-Translokation über die Plasmamembran (92) verändern.

d) Phospholipase C-induzierte Inositol-Phospholipid-Hydrolyse und Thrombozytenfunktion

Inositol-Phospholipid-Stoffwechsel und Kalzium-Mobilisierung wurden bisher mit folgenden Thrombozyten-Stimuli untersucht:

Thrombin (22-24, 30)

Kollagen (24, 26, 31)

PAF (Platelet activating factor) (25,32,34,91)

Arachidonsäure (27)

Endoperoxid Analoge (29)

Als physiologische Thrombozytenantworten wurden shape change, Freisetzungsreaktion und reversible bzw. irreversible Aggregation gemessen. Dabei wurde gefunden, daß eine Aktivierung der Phospholipase C eng mit der Aktivierung spezifischer Proteinkinasen und Thrombozytenveränderungen korreliert.

Während des Thrombozyten-shape changes, induziert durch niedrige Konzentrationen von PAF, Thrombin

oder Endoperoxid-Analoge, wird die Phospholipase C aktiviert. Es werden 1,2-Diacylglycerol, Phosphatidsäure, Inositolbisphosphat und Inositoltrisphosphat als Ausdruck dieser Aktivierung gebildet.

Als Zeichen der Aktivierung von Proteinkinasen werden eine vermehrte Phosphorylierung des 40 K Proteins, des Substrates der Proteinkinase C, und eine vermehrte Phosphorylierung des 20 K Proteins, des Substrates der Kalzium/Calmodulin abhängigen Myosin-lightchainkinase gefunden (27-29, 33).

Die Aktivierung der Phospholipase C und die Aktivierung spezifischer Proteinkinasen korreliert eng (Abb.15). Eine Arachidonsäurefreisetzung wird inkonstant beobachtet, jedoch erscheinen keine Lipoxxygenase- und Cyclooxygenase-Produkte (29, 34). Prostazyklin verhindert shape change und PLC-Aktivierung wahrscheinlich durch Erhöhung von zyklischem-AMP.

Mit Beginn der Thrombozyten-Freisetzungsreaktion und Aggregation entstehen Arachidonsäuremetabolite und ein zweiter steiler Anstieg von 1,2-Diacylglycerol und Phosphatidsäure.

Hemmung der Cyclooxygenase verhindert diesen zweiten Anstieg und auch die Aggregation. Daraus läßt sich folgern, daß Endoperoxide und TX A₂ als feedback-promoter wirken, das heißt zu einer weiteren Stimulation der Phospholipase C und damit zu einer Beschleunigung und Verstärkung der Thrombozytenantwort führen (26, 33, 34).

Für Thrombin gilt dieser Amplifikationsmechanismus nur für mittlere Konzentrationen, während bei Kollagen eine starke Abhängigkeit davon besteht (26).

III. FRAGESTELLUNG

Untersuchungen über Inositolphospholipide und Rezeptorfunktionen wurden bereits in den 50er Jahren von M.R. und L.E. Hokin begonnen (93). 1975 stellte Mitchell die Vermutung auf, daß der Phosphatidyl-Inositol-turn over kausal für eine Kalzium-Mobilisierung verantwortlich ist (87). In späteren Arbeiten wurde nachgewiesen, daß der Abbau der Inositolphospholipide eine Antwort auf externe Signale in vielen verschiedenen Zellen ist (37, 88).

Uns interessierte die Frage, was bewirkt eine Vasopressin-Stimulation im Phospholipidstoffwechsel von Thrombozyten, besteht eine Korrelation zwischen dem Phospholipidmetabolismus und den physiologischen Thrombozyten-Antworten?

Zeigen Thrombozyten auf Vasopressin-Stimulation hin ähnliche Veränderungen und Korrelationen, wie sie mit anderen Agonisten (Thrombin, Prostaglandin Endoperoxide, Arachidonsäure und PAF) gefunden werden konnten (26-29)?

Während des Thrombozyten-shape change's induzieren zum Beispiel Endoperoxid Analoge die Aktivierung von Phospholipase C und die Phosphorylierung spezifischer Proteine, was von dem Arachidonsäure-Metabolismus und der Freisetzung von ADP unabhängig zu sein scheint (29). Die gleiche Dissoziation von Phospholipase C und Arachidonsäure-Metabolismus konnte bei Stimulation der Thrombozyten mit Thrombin oder PAF

gezeigt werden (34). Können hier gleiche Ergebnisse mit Vasopressin beobachtet werden?

Welche Rolle spielt der Arachidonsäure-Metabolismus bei der Vasopressin-induzierten Thrombozytenaktivierung, wann erscheinen Cyclooxygenase- bzw. Lipoxxygenaseprodukte?

Endoperoxid-Analoga und andere Agonisten aktivieren die Phospholipase C unabhängig von extrazellulären Kationen (29, 34). Welchen Einfluß haben divalente Kationen, vor allem Kalzium und Magnesium, auf die Thrombozytenantwort nach Vasopressin-Stimulation?

Da möglicherweise verschiedene Inositolphospholipide (siehe Tabelle 3 und Abb. 10) durch Phospholipase C-Aktivität hydrolysiert werden, interessierte uns die Frage, welche Inositolphosphate entstehen in Vasopressin-stimulierten Thrombozyten und welche zeitliche Reihenfolge besteht?

Welche Metabolite könnten hier als second messenger in Frage kommen?

Weiterhin interessierte uns, welcher Rezeptor, V_1 - oder V_2 -Rezeptor, in Thrombozyten durch Vasopressin aktiviert wird. Wir untersuchten daher Vasopressin, (das einen V_1/V_2 -Agonisten darstellt), DDAVP, das ein V_2 -Agonist ist, und die Wirkung eines selektiven V_1 -Antagonisten.

IV. MATERIAL UND METHODIK

A MATERIAL

1. Fertige Substanzen

Lysin-Vasopressin wurde von der Firma Sigma bezogen und in wässriger Lösung ($100\ \mu\text{M}$) bei -20°C aufbewahrt.

1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin (DDAVP, Minirin) war von Ferring (Kiel, FRG). Der V_1 -Rezeptor-Antagonist $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr(Me)AVP}$ (1-(β -mercapto- β,β -cyclopentamethylenepropionicacid-2-O-methyltyrosin-4-valine, 8-D-arginin AVP), "Manning Compound", stammte von Bachem (Torrance, Kalifornien), und wurde als 1 mM Lösung in H_2O bei -20°C gelagert.

Arachidonsäure, 1,2-Diolein und Phosphatidsäure (jeweils in Chloroform gelöst), Apyrase (in H_2O gelöst zu $200\ \mu\text{g/ml}$), Prostaglandin E_1 (in Äthanol gelöst, $1\ \text{mg/ml}$), Inositolphospholipide, L- α -Phosphatidylinositol, L- α -Phosphatidylinositol 4-mono-phosphat, L- α -Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat, Dowex 1x8 (Chloridform, 100-200 mesh), Dowex-HCR-W2, Myoinositol -2-monophosphat, Phospholipase C von *Bacillus cereus* und Cyclohexylamine waren von Sigma (München, FRG).

Thromboxan B_2 (in Chloroform gelöst) und Prostacyclin wurden von Dr. J. Pike (Upjohn Co., Kalamazoo, Michigan) zur Verfügung gestellt. Prostacyclin ($1\ \text{mg/ml}$) wurde in Äthanol/10 mM Tris, pH 9, (9:1 v/v), gelöst.

Heparin (25 Units/ml) war von Braun-Melsungen (Melsungen, FRG). L-myo (2-³H) Inositol wurde von NEN bezogen, L-3-Phosphatidyl (U-¹⁴C) inositol, L-myo (U-¹⁴C) Inositol 1-monophosphat sowie (³H) Arachidonsäure (57 Ci/mmol) waren von Amersham.

(³H) Arachidonsäure war in Toluol gelöst und wurde bei -20⁰ C gelagert. Das Toluol wurde vor jedem Experiment unter N₂ verdampft.

Indomethacin war ein Produkt von Merck, Sharp und Dohme (München) und wurde als 5 mM Lösung in Äthanol bei -20⁰ C gelagert.

Silica gel 60 DC Platten wurden von Merck (Darmstadt, FRG) bezogen. ITLC-SA sheets, mit Kieselsäure imprägnierte Papierfolien, stammten von Gelman Sciences (Ann Arbor, MI, USA), Chromatographiepapier No.1 von Whatman.

Zwei 2-Kanal-Aggregometer waren von Fresenius (Bad Homburg, FRG).

2. Lösungen und Puffer

Als Antikoagulans wurde folgende ACD-Lösung verwendet:

Na-Citrat (Trisnatrium-Citrat x 5 H₂O)

85 mM 24,99 g/l

Dextrose

111 mM 19,98 g/l

Zitronensäure

71 mM 14,91 g/l

Die Einstellung auf pH 5,5 erfolgte mit konzentrierter Natronlauge.

Für das Waschen und die Resuspension der Thrombozyten wurde ein Tyrode-Hepes-Puffer folgender Zusammensetzung hergestellt:

		g/l
NaCl	138 mM	8,06
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,36 mM	0,05
KCl	2,9 mM	0,216
NaHCO ₃	12 mM	1,0
Hepes	5 mM	1,39
MgCl ₂ .6 x H ₂ O	1,0 mM	0,203
CaCl ₂ .6 x H ₂ O	0,1 mM	0,0219
Glukose	5,5 mM	1,0

Der pH wurde auf 7,35 eingestellt.

3. Herstellung von HHT und 12-HETE

12-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid (HHT) und 12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid (12-HETE) wurden durch Inkubation von Thrombozyten mit Arachidonsäure auf folgende Weise gewonnen:

Plättchenreiches Plasma (1200 ml) von der Blutbank wurde mit PGI_2 (300 ng/ml) versetzt und für 20 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit 300 ml 1 mM EGTA-Tyrode-Hepes-Puffer unter Zugabe von PGI_2 (300 ng/ml) wurden die Thrombozyten in 100 ml 1 mM EGTA-Tyrode-Hepes-Puffer resuspendiert und mit Arachidonsäure (10 mg in 100 μl Äthanol gelöst) bei 37° C für 10 min unter Rühren mit einem Magnetrührer inkubiert.

Nach der Inkubation wurde Rinderserumalbumin (30 mg/ml), welches keine freien Fettsäuren enthielt, zugegeben und die Thrombozytensuspension wurde zentrifugiert.

Der Überstand wurde nach Bligh und Dyer unter Zugabe von Ameisensäure extrahiert (siehe S. 52).

4. Präparation von Inositolphosphaten und Glyzerophospho-Inositolphosphaten

Inositol-1-monophosphat, Inositol 4-monophosphat, Inositol 1,4-bisphosphat und Inositol 1,4,5-trisphosphat wurden durch alkalische Hydrolyse von Inositolphospholipiden hergestellt (97). Dazu wurden Inositolphospholipide (25-30 mg) in 5 ml einer 2 N KOH gelöst, unter Rückfluß 30 min gekocht und auf eine Dowex HCR-W2 Säule aufgetragen.

Das wäßrige Eluat (30 ml) wurde dreimal mit Diäthyläther extrahiert, um freie Fettsäuren zu entfernen, und nach Zugabe von Cyclohexylamin im Rotationsverdampfer bei 45⁰ C eingedampft und über absteigende Papierchromatographie für 30 Stunden gereinigt (97, 98). Man erhielt dadurch eine Mischung von jeweils zwei Isomeren von Glyzerophosphat, Inositol Monophosphat, -bisphosphat und -trisphosphat, welche mit Ammoniummolybdat-Spray teilweise angefärbt wurden (82).

Die langsam laufenden Komponenten der zwei Isomere von Inositol-Bisphosphat und Inositol-Trisphosphat sind Inositol 1,4-bisphosphat und Inositol 1,4,5-trisphosphat (97). Die Inositol-Monophosphat-Bande enthält hauptsächlich Inositol 4-monophosphat und geringe Mengen Inositol 1-monophosphat (97).

Die diesen Substanzen entsprechenden, nicht angefärbten Zonen wurden mit H_2O eluiert.

Inositol 1,4-bisphosphat und Inositol 1,4,5-trisphosphat wurden auch durch alkalische Hydrolyse von reinem Phosphatidylinositol 4-monophosphat und Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat gewonnen.

Glyzerophospho - Inositol wurde durch milde alkalische Hydrolyse von Phosphatidylinositol hergestellt (99).

B METHODIK

1. Herstellung von Plättchenreichem Plasma (PRP):

Es wurde peripheres, venöses Blut von gesunden, männlichen Spendern im Alter von 20 bis 45 Jahren entnommen. Alle Spender verneinten eine Medikamenteneinnahme während der letzten acht Wochen.

Mit einer sterilen Polypropylenspritze wurden entweder 50 ml (für die Inositolphosphat-Messung) oder 200 ml Blut (für die Messung der Thrombozytenlipide) unter minimaler Blutstauung in 0,15 Vol. ACD (siehe S.45) aufgenommen. Das Blut wurde vorsichtig mit ACD gemischt, in Plastikröhrchen umgefüllt und bei Raumtemperatur für 15 min bei 150 g zentrifugiert. Anschließend wurde das plättchenreiche Plasma vorsichtig abpipettiert.

2. Messung der Phospholipase C-Aktivierung und des Arachidonsäure-Stoffwechsels in mit (^3H) Arachidonsäure prämarkierten Thrombozyten in Beziehung zur Thrombozyten-Funktion

400 μCi (^3H) Arachidonsäure, die in Toluol gelöst war, wurde unter N_2 getrocknet, in Äthanol gelöst und mit plättchenreichem Plasma von 200 ml Blut bei 37°C im Wasserbad für 90 min inkubiert.

Zur Hemmung der Thrombozytenaktivierung während der

Inkubation wurde PGE_1 ($1 \mu\text{g/ml}$) dazugegeben. Nach 90 min Inkubation wurde das PRP 10 min bei 1200 g in Raumtemperatur zentrifugiert und das plättchenarme Plasma (PPP) dekantiert.

Der Einbau der zugegebenen (^3H) Arachidonsäure in die Thrombozyten wurde in einem Aliquot von 0,1 ml nach folgender Formel gemessen:

$$100 \% - \frac{\text{Radioaktivität im PPP}}{\text{Radioaktivität im PRP}} \text{ in \%} = \text{Inkorporation in TZ in \% der } (^3\text{H}) \text{ Arachidonsäure}$$

Die Thrombozyten wurden anschließend mit 30 ml eines vorgewärmten Tyrode-Hepes-Puffer (siehe unter Materialien) einmal gewaschen.

Die Pufferlösung enthielt zusätzlich 25 Units/ml Heparin und $200 \mu\text{g/ml}$ Apyrase. Apyrase wurde zugegeben, um Spuren von ADP, die evtl. aus lysierten roten Blutkörperchen oder aus geschädigten Thrombozyten stammten, zu inaktivieren.

Zur Verhinderung jeglicher Thrombozytenaktivierung während der Zentrifugation und Thrombozytenresuspension wurde außerdem PGI_2 (300 ng/ml) zugegeben. Die Thrombozytensuspension wurde bei Raumtemperatur für 10 min bei 800 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Thrombozytenpellet wurde in 20 ml Tyrode-Hepes-Puffer, der $200 \mu\text{g/}$

ml Apyrase enthielt, resuspendiert und bei 37⁰ C aufbewahrt. Die Thrombozytenzahl wurde mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskopes auf 5×10^8 TZ/ml eingestellt. Das Experiment wurde 30 - 45 min nach Resuspension begonnen.

Proben der Thrombozytensuspension (1,2 ml oder 1,6 ml) wurden in Aggregometerküvetten pipettiert und im Aggregometer bei 37⁰ C durch einen Magnetrührer bei 1100 Umdrehungen/min gerührt. Agonisten (Vasopressin oder DDAVP) wurden nach 3 min zu der Thrombozytensuspension zugegeben. Hemmstoffe oder Antagonisten wurden 3 min vor der Thrombozytenstimulation durch Vasopressin dazupipettiert.

Shape change und Aggregation der Thrombozyten wurden mit Hilfe von zwei 2-Kanal-Aggregometern gemessen. Dabei wurde die Änderung der Lichttransmission auf zwei 2-Kanalschreibern kontinuierlich aufgezeichnet. Der Thrombozyten-shape change wird angezeigt durch einen minimalen Abfall der Lichttransmission und eine Verminderung der Oszillationen, die durch die normalerweise diskoiden Thrombozyten verursacht werden. Die Thrombozytenaggregation verursacht einen Anstieg der Lichttransmission (Abb. 16).

Aliquots (0,2 ml) der Thrombozytensuspension wurden vor (Kontrolle) und nach Zugabe des Agonisten in 0,75 ml Chloroform/Methanol 1:2 pipettiert, wodurch die Inkubation gestoppt wurde.

Vor der Extraktion der Thrombozytenphospholipide wurden unmarkierte Standards (20 µg) von Phosphatid-

säure und 1,2-Diolein zugegeben, und die Proben wurden nach weiterer Zugabe von 0,25 ml Chloroform und 0,25 ml 0,2 % Ameisensäure auf einem Vortex geschüttelt und nach Bligh und Dyer extrahiert.

Zur vollständigen Trennung der organischen von der wässrigen Phase wurden die Proben noch 10 min bei 2500 g zentrifugiert. Die organische Phase wurde abpipettiert und im Vakuum verdampft.

Die Trennung der verschiedenen radioaktiven Thrombozyten-Lipide erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (TLC). Dafür wurden die Proben in jeweils 50 μ l Chloroform gelöst und auf Kieselgelplatten aufgetragen.

Zur Separation von Phosphatidsäure, Thromboxan B₂, HHT, HETE und Arachidonsäure wurde folgendes TLC-System benützt (22):

Die obere Phase von Essigsäureäthylester/2,2,4-Trimethylpentan/Essigsäure/H₂O (90:50:20:100), wobei pro 100 ml der oberen Phase 1 ml konzentrierte Essigsäure zugegeben wurde.

Zur Separation von 1,2-DG und anderen neutralen Lipiden wurde das TLC-System nach Rittenhouse verwendet: Benzol/Diäthyläther/Äthanol/25 % Ammoniaklösung (100:80:4:0,4) (23).

Die Substanzen wurden durch Cochromatographie mit unmarkierten Standardsubstanzen lokalisiert, welche durch sublimiertes Jod in einem geschlossenen Tank

gelb-braun angefärbt wurden.

Die entsprechenden Zonen wurden mit einem Spatel ausgekratzt und nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit wurde die (^3H)-Radioaktivität in einem β -Szintillationszähler 10-20 min gemessen bis der Zählfehler unter 5 % lag.

3. Messung der Inositolphosphate in mit (^3H) Inositol prämarkierten Thrombozyten in Beziehung zur Thrombozytenfunktion

PRP von 50 ml Blut wurde nach Zugabe von Prostazyklin (300 ng/ml) zentrifugiert und die Thrombozyten wurden in 1 ml eines Ca^{++} -freien Tyrode-Hepes-Puffer, der 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , Apyrase (100 $\mu\text{g/ml}$) und PGI_2 (0,5 $\mu\text{g/ml}$) enthielt, resuspendiert. Die Thrombozytensuspension wurde für 3 Stunden in Aggregometer-Küvetten bei 37°C unter ständigem Rühren (250 rpm) mit (^3H) Inositol (2mCi) inkubiert.

Nach Zugabe von Prostazyklin (500 ng/ml) wurden die Thrombozyten bei 800 g zentrifugiert und einmal in 8 ml Tyrode-Hepes-Puffer (siehe unter Materialien) gewaschen. Dieser Waschpuffer enthielt zusätzlich Inositol (5 mM), Heparin (25 Units/ml), Apyrase (200 $\mu\text{g/ml}$) und Prostazyklin (300 ng/ml).

Nach Zentrifugation wurden die Thrombozyten in 1,5-2 ml Tyrode-Hepes-Puffer, der Apyrase (200 $\mu\text{g/ml}$) enthielt, resuspendiert. Die Thrombozytenzahl wurde

auf $1 - 1,3 \times 10^9$ / ml eingestellt, und die Thrombozytensuspension bei 37°C aufbewahrt. Das Experiment wurde 30 min später begonnen.

Proben der Thrombozytensuspension (0,8 ml) wurden in Aggregometerküvetten gefüllt, LiCl (10 mM) wurden zugegeben und die Thrombozytensuspension wurde bei 37°C mit 1100 Umdrehungen/min gerührt. Nach 3 min wurde Vasopressin oder DDAVP dazu pipettiert. Shape change und Aggregation wurden gemessen.

Aliquots (0,1 ml) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten in 0,375 ml Chloroform/Methanol/Konzentrierte HCl (100:200:2) überführt. Danach wurde ein Gemisch von unmarkiertem Glycerophosphoinositol, Inositol 1-monophosphat, Inositol 2-monophosphat, Inositol-1,4-bisphosphat und Inositol 1,4,5-trisphosphat zugegeben.

Die H_2O -löslichen Inositolphosphate wurden nach Zugabe von 1,25 ml Chloroform und 0,125 ml H_2O extrahiert und die wässrigen Phasen nach Abdampfen von restlichem Chloroform/Methanol unter N_2 tiefgefroren und lyophilisiert.

Die Inositolphosphate wurden über Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) getrennt. Die HPLC-Ausrüstung (von Waters Assoc., Milford, MA) enthielt eine Vorsäule (Bondpak AX/Carasil, 37-50 μ), eine Trennsäule (μ -Bondapak NH_2 , 30 cm x 3,9 mm), zwei Lieferpumpen und einen Programmierer.

Die trockenen Proben wurden in 200 - 300 μ l des initialen HPLC-Puffers aufgenommen. Die Trennung erfolgte über eine 20-minütige isokratische Elution mit einem 60 mM Ammoniumazetat/Essigsäure-Puffer, pH 4,0, gefolgt von einem 120-minütigen linearen Gradienten auf 2 M Ammoniumazetat/Essigsäure, pH 4,0, mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 1 ml/min (101).

In den Fraktionen wurde die (^3H)-Radioaktivität mit einem Beckmann β -Szintillationszähler gemessen und der anorganische Phosphor der Inositolphosphate bestimmt (102). Die radioaktiven Inositolphospholipide wurden in gesonderten Proben bestimmt:

100 μ l Thrombozytensuspension wurden in 0,375 ml Chloroform/Methanol/konzentrierte HCl (100:200:2) überführt, und organische und wässrige Phase wurden nach Zugabe von 0,125 ml Chloroform und 0,125 ml 2 M KCl getrennt.

Die organische Phase wurde abpipettiert und die wässrige Phase einmal mit 0,5 ml Chloroform gewaschen. Diese organische Phase wurde mit der ersten gepoolt und verdampft. Die radioaktiven Inositolphospholipide wurden nach Zugabe eines Gemisches von unmarkierten Inositolphospholipiden (50 μ g) in Chloroform/Methanol (1:2) gelöst und über Kieselgel DC 60 Platten, die mit 1% Kaliumoxalat in Methanol/H₂O (40:60) imprägniert waren (103), getrennt.

Folgendes TLC-System (103) wurde verwendet:

Chloroform/Azeton/Methanol/Konzentrierte Essigsäure/H₂O

(40 : 15 : 13 : 12 : 8).

Die radioaktiven Inositolphospholipide wurden durch Cochromatographie mit unmarkierten Inositolphospholipid-Standards lokalisiert, welche mittels Joddampf sichtbar gemacht wurden. Die entsprechenden Zonen wurden mit einem Spatel ausgekratzt und nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit wurde die Radioaktivität gemessen.

4. Auswertung der Ergebnisse

Thrombozytenlipide:

Pro Experiment wurden mindestens zwei Essays durchgeführt. Die Radioaktivität des unstimulierten Kontrollwertes wurde 100 % gesetzt. In den Kontrollproben betrug der gemessene Radioaktivitätsbereich (cpm(³H)) für die verschiedenen Thrombozyten-Lipide:

Für Phosphatidsäure:	200 - 1000	cpm(³ H)
Für 1,2 DG	: 100 - 300	cpm(³ H)
Für Arachidonsäure	: 400 - 3000	cpm(³ H)
Für Thromboxan B ₂	: 100 - 300	cpm(³ H)
Für HHT	: 100 - 500	cpm(³ H)

Für 12-HETE : 150 - 1600 cpm(^3H)

Diese von Experiment zu Experiment unterschiedlichen Kontrollwerte beruhen teils auf den unterschiedlichen Einbauraten von (^3H)-Arachidonsäure in die Thrombozyten-Phospholipide (Einbaurate 20 - 50 %).

Aus den Mittelwerten der Einzelexperimente verschiedener Blutspender und der Anzahl der Experimente wurde der Mittelwert ($\bar{x}$) und die mittlere Standardabweichung (SE) berechnet.

Inositollipide:

Zirka 0,5-1 % des zugegebenen (^3H)Inositol wurde in die Inositollipide der Thrombozyten eingebaut. Das Verhältnis der mit (^3H)Inositol markierten Inositollipide zu einander war folgendermaßen:

PtdIns	:	22,7 $\pm$ 6
PtdIns4P	:	3,3 $\pm$ 0,8
PtdIns4,5P ₂	:	1

Aus den Mittelwerten der Einzelexperimente und der Anzahl der Experimente (n=7) wurde der Mittelwert ($\bar{x}$) und die mittlere Standardabweichung (SE) berechnet. Das Verhältnis der mit (^3H)Inositol radioaktiv markierten Inositollipide ist damit dem Verhältnis der unmarkierten Inositollipide in Thrombozyten sehr ähnlich.

V. ERGEBNISSE

A WIRKUNGEN VON VASOPRESSIN UND DDAVP AUF DIE THROMBOZYTENFUNKTION

1. Aggregation in Thrombozytenreichem Plasma

Thrombozytenreiches Plasma wurde mit Zitrat versetzt und mit Vasopressin (100 nM und 1 μ M) stimuliert. Shape change und Aggregation wurden mit einem 2-Kanal-Aggregometer gemessen.

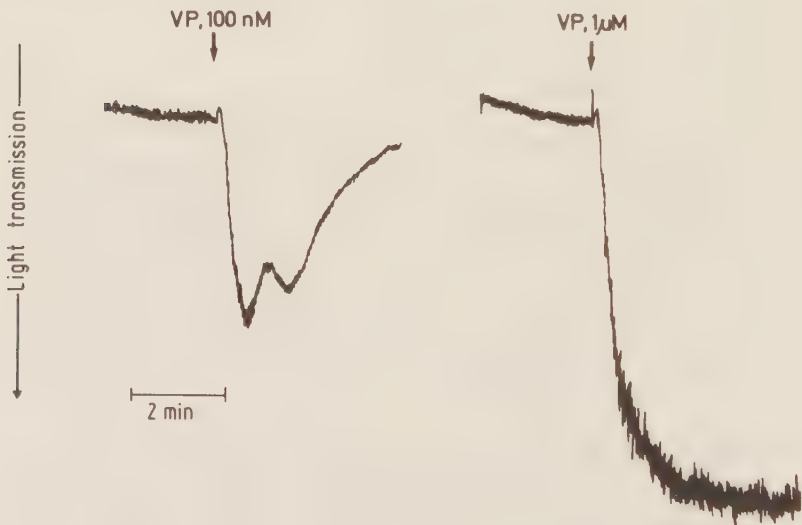


Abb. 16: Aggregationskurven von menschlichen Thrombozytenreichen Plasmen nach Stimulation mit Vasopressin

2. Aggregation in gewaschenen Thrombozyten

Thrombozyten wurden mit (H^3) Arachidonsäure markiert, in Tyrode-Hepes-Puffer resuspendiert und mit Vasopressin von Konzentrationen 1 nM bis 1 μ M stimuliert. Nach Stimulation mit Vasopressin erhielt man von menschlichen gewaschenen Thrombozyten folgende Aggregationskurven, die sehr ähnlich den Aggregationskurven von plättchenreichem Plasma sind (vergleiche Abb. 16 und Abb. 17).

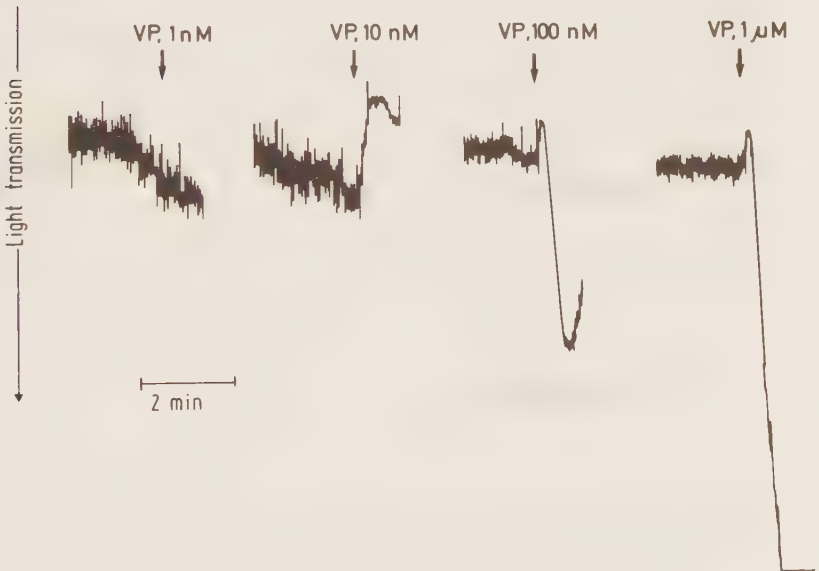


Abb. 17: Aggregationskurven von menschlichen gewaschenen Thrombozyten nach Stimulation mit Vasopressin

Weitere Aggregationskurven von menschlichen Thrombozyten nach Stimulation mit Vasopressin:

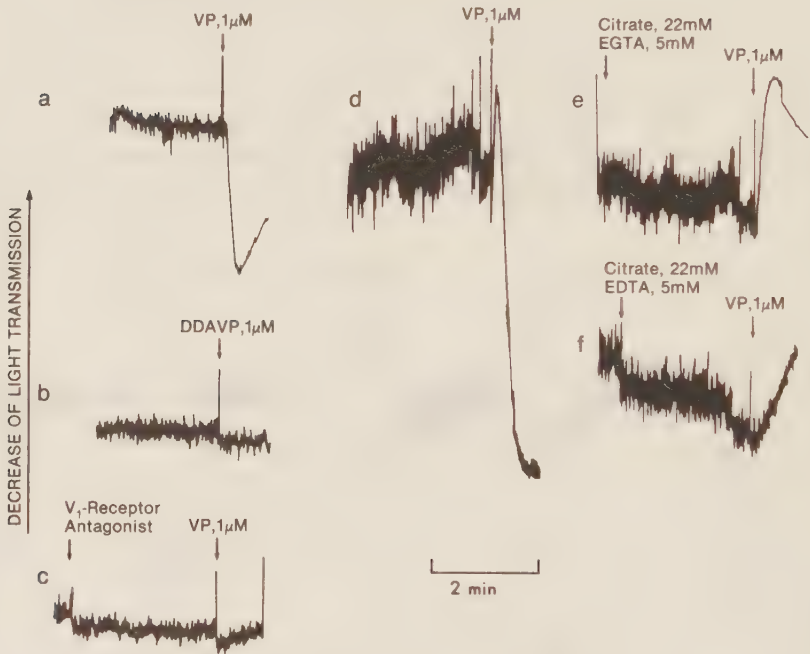


Abb. 18:

Aggregationskurven von menschlichen Thrombozyten nach Stimulation mit Vasopressin

Thrombozyten wurden entweder mit (3 H) Inositol (Abb. 18 a-c) oder mit (3 H) Arachidonsäure (Abb. 18 d-f) markiert, in Tyrode-Hepes-Puffer resuspendiert und verschiedenen Stimuli ausgesetzt: Vasopressin 1 μ M (a), 1-desamino-8-D-arginin Vasopressin (DDAVP) 1 μ M (b),

V₁-Rezeptor Antagonist d (CH₂)₅Tyr(Me)AVP 0,1 μ M plus Vasopressin 1 μ M (c), Vasopressin 1 μ M (d), Zitrat 22 mM plus EGTA 5 mM plus Vasopressin 1 μ M (e), Zitrat 22 mM plus EDTA 5 mM plus Vasopressin 1 μ M (f).

Der Tyrode-Hepes Puffer enthielt MgCl₂ (1 mM), CaCl₂ (0,1 mM) und Apyrase (200 μ g/ml).

Wirkung von Vasopressin-Analogen DDAVP:

Anstelle von Vasopressin wurde der V₂-Rezeptor Agonist DDAVP (1 μ M) verwendet. DDAVP führte weder im Aggregometer zu physiologischen Thrombozyten Antworten (Abb. 18 b), noch konnten die bei Vasopressin gemessenen Veränderungen im Lipidstoffwechsel nachgewiesen werden (siehe Tabelle 5, S. 87). Im Aggregometer führte DDAVP weder zu shape change noch zu einer Aggregation.

Die geringen Erhöhungen der Bildung von Diazylglyzerol und Freisetzung von Arachidonsäure sind statistisch nicht signifikant (siehe Abb. 19).

3. Variabilität

Die Vasopressinwirkung auf die Thrombozytenfunktion war bei verschiedenen Probanden unterschiedlich. Nicht immer konnte mit einer Vasopressin-Konzentration von 1 μ M eine irreversible Aggregation beobachtet und die Bildung von Arachidonsäure-Metabolite gemessen werden. Die Ursache hierfür ist bisher noch unbekannt. (Vergleiche die reversible Aggregation in Abb. 18a und shape change mit irreversibler Aggregation in Abb. 18d nach Stimulation mit 1 μ M VP).

B WIRKUNG VON VASOPRESSIN AUF DIE PHOSPHOLIPASE C-AKTIVIERUNG UND DEN ARACHIDONSÄURE-STOFFWECHSEL

Gewaschene Thrombozyten, die mit (^3H) Arachidonsäure markiert und in Tyrode-Hepes-Puffer resuspendiert wurden, wurden mit Vasopressin stimuliert. Funktionelle Thrombozytenantworten und Änderungen der mit (^3H) Arachidonsäure markierten Thrombozyten-Lipide sind simultan gemessen worden.

Vasopressin in niedrigen Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-8} M) induzierte nur shape change ohne nachfolgende Aggregation, während höhere Vasopressin-Konzentrationen (10^{-7} - 10^{-6} M) shape change mit Aggregation hervorriefen, wobei eine Vasopressin-Konzentration von 10^{-6} M irreversible Aggregation bewirkte (siehe Abb. 17).

Vasopressin in einer Konzentration von 10^{-6} M stimuliert die schnelle Bildung von 1,2-Diazylglycerol und Phosphatidsäure. 1,2-Diazylglycerol erreichte den Maximalwert (20 sec nach Vasopressin-Zugabe) vor der Phosphatidsäure (60 sec nach Vasopressin-Zugabe), was darauf schließen läßt, daß Phospholipase C und 1,2-Diazylglycerol-Kinase nacheinander aktiviert werden. Freie Arachidonsäure erschien ebenfalls unmittelbar nach der Stimulation, während die Bildung von Cyclooxygenase-Produkten wie HHT und TXB_2 um 20 sec verzögert war. Der Anstieg des Lipoxygenase-Produktes 12-HETE wurde sogar noch später gefunden (Abb. 19).

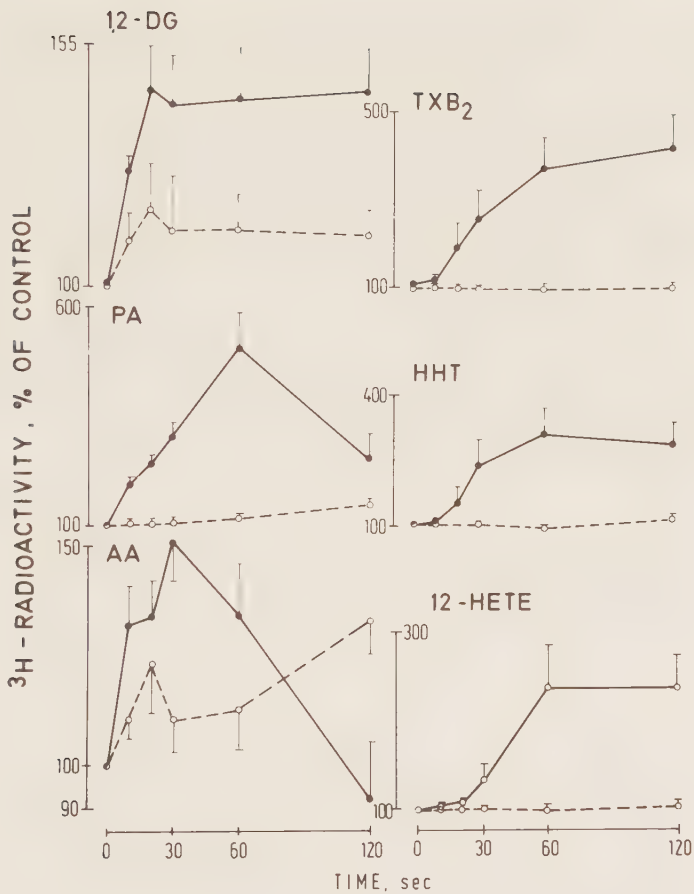


Abb. 19: Effekt von Vasopressin (•—•) und DDAVP (○—○) auf die Bildung von 1,2-Diacylglycerol und Phosphatidsäure, die Freisetzung von Arachidonsäure und die Produktion von Arachidonsäure-Metaboliten:

Proben von Thrombozytensuspensionen (1,6 ml) wurden mit (^3H) Arachidonsäure markiert und entweder 1 μM Vasopressin ($\bullet \longrightarrow$) oder DDAVP ($\bullet - - \bullet$) ausgesetzt. Aliquots (0,2 ml) wurden nach verschiedenen Zeiten in ein Chloroform/Methanol-Gemisch überführt, die (^3H)-Radioaktivität in den Thrombozytenlipiden gemessen. Die Daten sind mittlere Standardabweichungen von vier Experimenten.

1,2-DG, 1,2-Diazylglycerol. PA, Phosphatidsäure.
 AA, Arachidonsäure. TXB_2 , Thromboxan B_2 . HHT, 12-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid. 12-HETE, 12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid.

Der Effekt von Vasopressin auf den Thrombozyten-lipidstoffwechsel war konzentrationsabhängig (Abb.20).

Niedrige Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-7} M) zeigten nur einen shape change mit der Bildung von 1,2-Diazylglyzerol, Phosphatidsäure und geringen Mengen Arachidonsäure, die jedoch nicht von der Zyklooxygenase oder Lipoxygenase weiter metabolisiert wurden. Vasopressin-Konzentrationen von 10^{-9} M induzierten nur in manchen Experimenten einen shape change.

Bei einer Konzentration von 10^{-7} M wurden shape change, reversible Aggregation und eine erhöhte Bildung von 1,2-Diazylglyzerol, Phosphatidsäure und Arachidonsäure beobachtet.

Höhere Konzentrationen (10^{-6} M) bewirkten eine irreversible Aggregation, erhöhten die Mengen an gebildetem 1,2-Diazylglyzerol, Phosphatidsäure und Arachidonsäure und führten zusätzlich zur Bildung von HHT, 12-HETE und TXB_2 .

Nach diesen Resultaten korrelieren shape change und reversible Aggregation mit der Bildung von 1,2-Diazylglyzerol und Phosphatidsäure, nicht aber mit dem Arachidonsäuremetabolismus.

Niedrige Vasopressin-Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-7} M) stimulieren somit die Bildung von 1,2-Diazylglyzerol und Phosphatidsäure über die Aktivierung der Phospholipase C ohne Bildung von Arachidonsäuremetaboliten und ohne Freisetzungsreaktion.

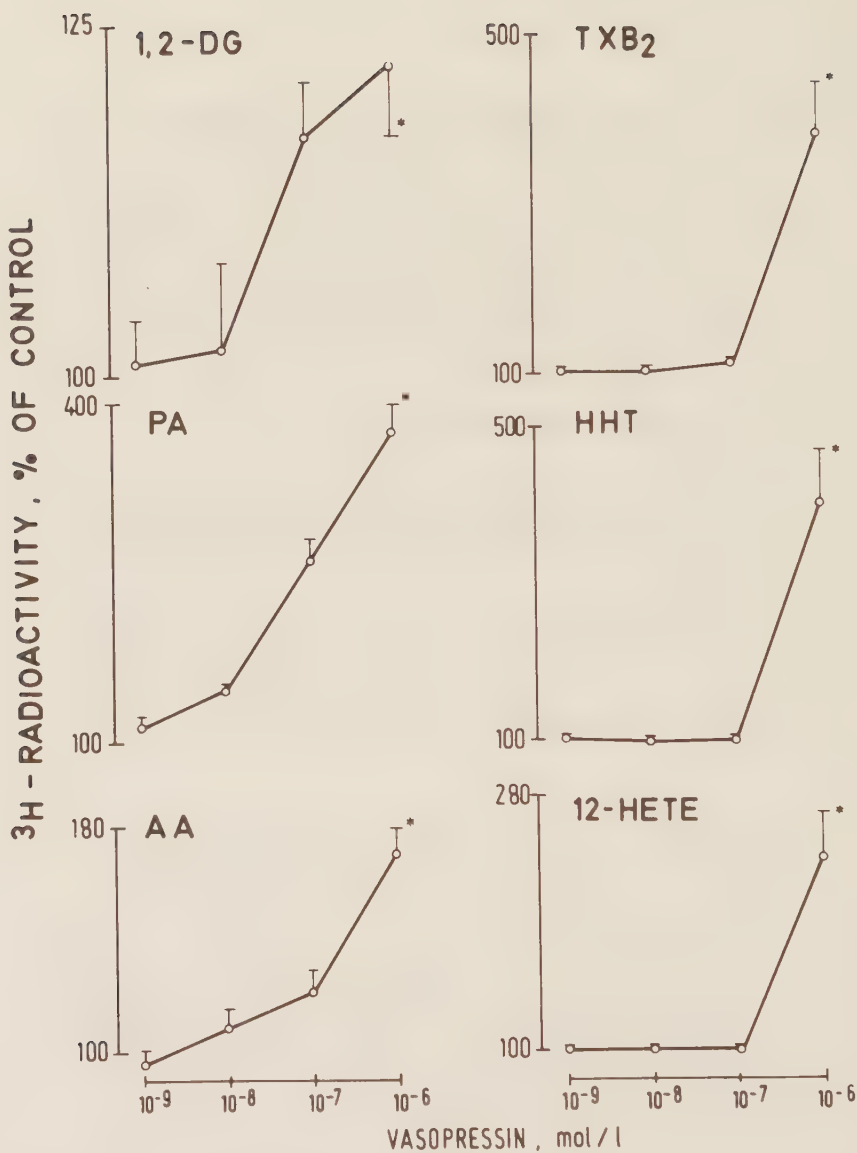


Abb. 20: Effekt verschiedener Vasopressin-Konzentrationen auf die Aktivierung der Phospholipase C und den Arachidonsäure-Metabolismus in menschlichen Thrombozyten

Beschreibung Abb.20 :

Thrombozyten wurden mit (^3H) Arachidonsäure markiert und mit Vasopressin stimuliert. 10 Sekunden nach Zugabe von Vasopressin wurde 1,2-Diazylglyzerol, nach 30 Sekunden Phosphatidsäure und Arachidonsäure und nach 60 Sekunden Arachidonsäure-Metabolite gemessen.

Die Daten geben den Mittelwert + SE von sechs Einzelexperimenten an. (+) bedeutet irreversible Aggregation und Freisetzung von (^{14}C) Serotonin bei einer Stimulation mit $1\text{ }\mu\text{M}$ Vasopressin.

C WIRKUNGEN VON VASOPRESSIN AUF DIE BILDUNG VON INOSITOLPHOSPHATEN

Menschliche Thrombozyten wurden mit (^3H) Inositol markiert und mit Vasopressin stimuliert ($1\ \mu\text{M}$), wodurch es zu shape change und reversibler Aggregation kam (Abb. 18a). Vasopressin stimulierte die Bildung von vier mit (^3H) Inositol markierten Fraktionen, welche mit unmarkierten Standards über HPLC cochromatographiert wurden (Abb. 21).

Als unmarkierte Standards dienten Inositol 1-monophosphat, Inositol 2-monophosphat, Inositol 1,4-bisphosphat und Inositol 1,4,5-trisphosphat (Abb. 21).

Es wurde beobachtet, daß Inositol 2-monophosphat nicht genau mit dem (^3H) Inositol markierten Plak der 60 Sekunden nach Stimulation mit Vasopressin gebildet wurde, cochromatographierte (Abb. 21c). Deshalb wurde nun ein anderes HPLC-System benutzt, welches die Trennung von folgenden drei Inositol-Monophosphaten ermöglichte: Inositol 1-, Inositol 2- und Inositol 4-monophosphat.

In diesem System fanden wir, daß die radioaktiven Inositol-Monophosphate, welche in der Kontrolle und in mit Vasopressin stimulierten Thrombozyten gebildet wurden, mit Inositol 1-Monophosphat und Inositol 4-Monophosphat koeluierten (Abb. 22).

Die Bildung von Inositol 1,4-bisphosphat und Inositol 1,4,5-trisphosphat wurde 5 Sekunden nach Zugabe von Vasopressin beobachtet, während Inositol 1-monophosphat und Inositol 4-monophosphat erst nach

einer Zeitspanne von 10 Sekunden anstiegen (Abb. 21 und 23).

Die Bildung von Inositol 1,4-bisphosphat und Inositol 1,4,5-trisphosphat erreichte nach 30 Sekunden ihr Maximum und nahm dann wieder ab. Im Gegensatz dazu akkumulierte während der getesteten Zeit Inositol 1-monophosphat und Inositol 4-monophosphat kontinuierlich (Abb. 23).

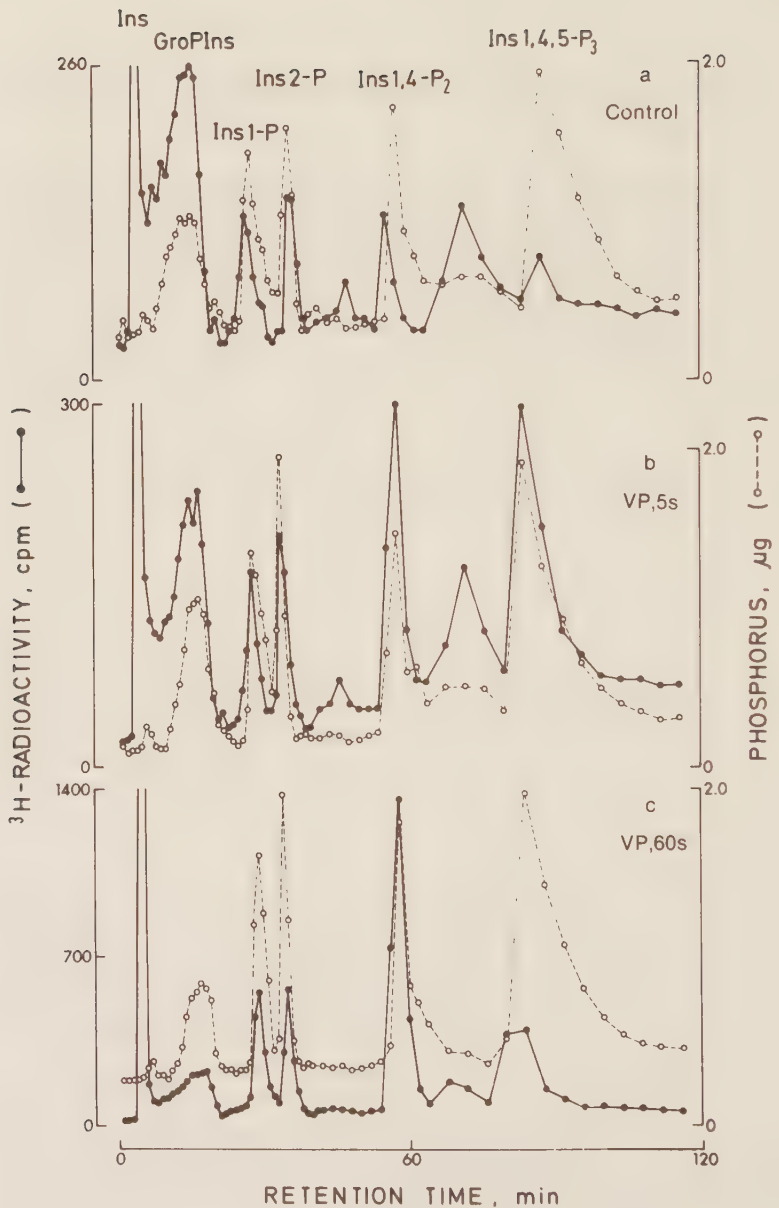


Abb. 21: Trennung der Inositolphosphate mit Hilfe von HPLC nach Stimulation menschlicher Thrombozyten mit Vasopressin (VP)

Beschreibung Abb. 21:

Menschliche Thrombozyten, die mit (^3H) Inositol prämarkiert wurden, sind entweder mit Puffer (a), Vasopressin ($1\ \mu\text{M}$) für 5 Sekunden (b) oder 60 Sekunden (c) inkubiert worden. Aliquots ($0,2\ \text{ml}$) der Thrombozytensuspension wurden in ein Chloroform/Methanol/ HCl -Gemisch überführt, und ein Gemisch von unmarkiertem Glycerophosphoinositol und Inositolphosphaten wurde zugegeben.

Die Proben wurden extrahiert und über HPLC getrennt. In den Fraktionen wurden die (^3H) Radioaktivität (—) und der anorganische Phosphor (o--o) gemessen.

Die Einbaurrate von (^3H) Inositol in Inositolipide von $0,2\ \text{ml}$ Thrombozytensuspension betrug in diesem Experiment:

für PtdIns	148400 cpm
für PtdIns4P	29400 cpm
für PtdIns4,5P _p	12390 cpm

Die Recovery der zugegebenen Standards nach HPLC-Extraktion betrug:

Für GroPIns $39 \pm 6\ \%$; für Ins1-P $69 \pm 8\%$, für Ins2-P $71 \pm 8\ \%$, für Ins1,4P₂ $67 \pm 9\ \%$ und für Ins1,4,5P₃ $51 \pm 1\%$.

Die Abkürzungen im oberen Feld bezeichnen die Elutionspositionen der zugegebenen unmarkierten Standards nach HPLC (o--o).

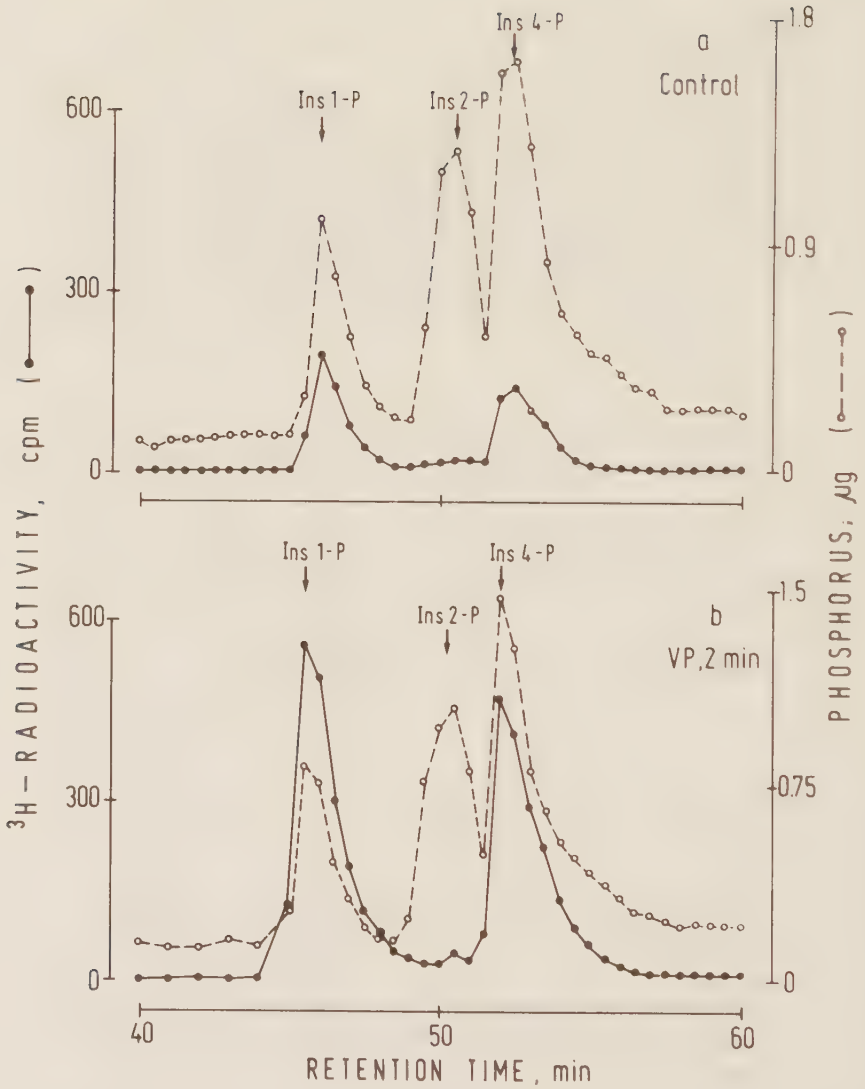


Abb. 22: Trennung von Inositol-Monophosphaten mit Hilfe von HPLC nach Stimulation mit Vasopressin (VP)

Beschreibung Abb. 22:

Menschliche Thrombozyten wurden mit (^3H) Inositol prämarkiert und entweder mit Puffer (a) oder Vasopressin ($1\text{ }\mu\text{M}$) für zwei Minuten inkubiert. Aliquots (0,2 ml) der Thrombozytensuspension wurden in ein Chloroform/Methanol/HCl-Gemisch überführt und ein Gemisch von unmarkiertem Inositol 1-Monophosphat, Inositol 2-Monophosphat und Inositol 4-Monophosphat wurde zugefügt.

Die Proben wurden extrahiert, über Dowex-Anion-Austausch-Chromatographie gereinigt und über HPLC getrennt. Die Fraktionen wurden alle 0,5 Minuten gesammelt und die (^3H) Radioaktivität (—) und der anorganische Phosphor (o--o) gemessen.

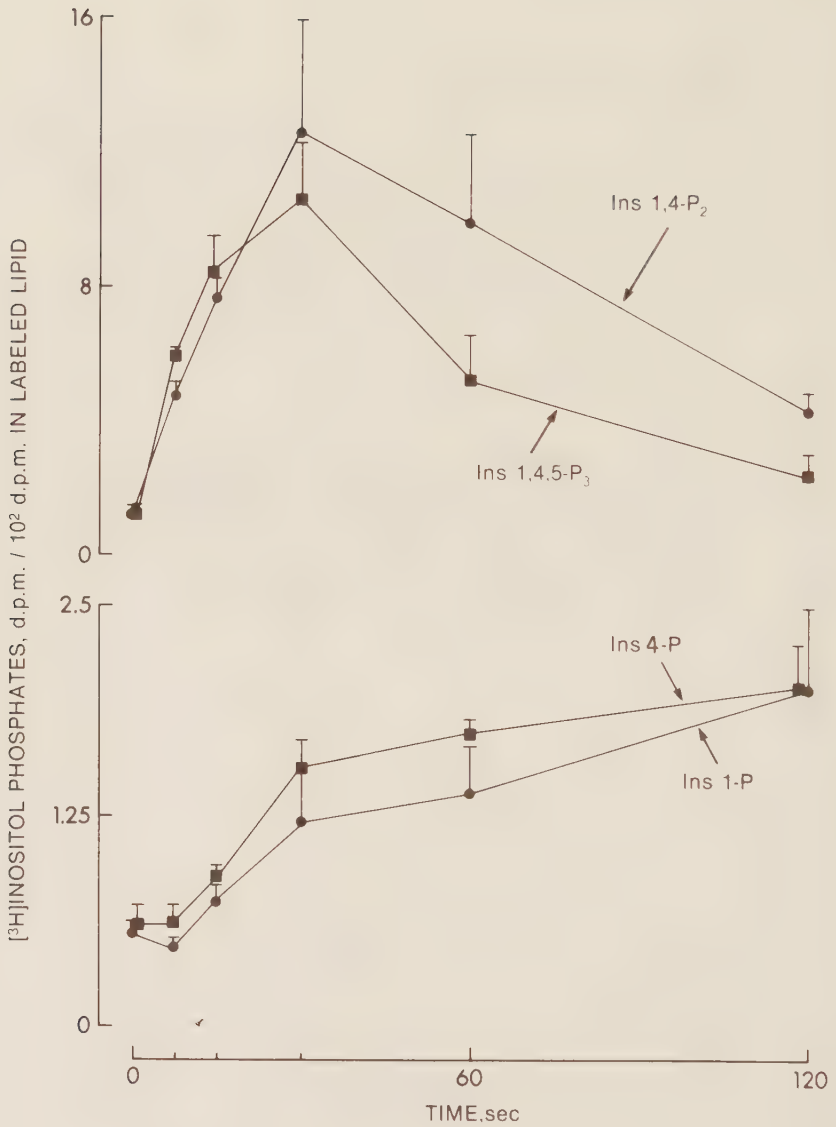


Abb. 23: Zeitkurve der Bildung von Inositolphosphaten in menschlichen Thrombozyten, die mit Vasopressin stimuliert wurden.

Beschreibung Abb. 23:

Suspensionen von menschlichen Thrombozyten (0,8 ml, $1-1,3 \times 10^9$ Thrombozyten pro ml) wurden mit (^3H) Inositol markiert und mit Vasopressin ($1 \mu\text{M}$) für unterschiedlich lange Zeiten inkubiert.

Aliquots (0,1 ml) wurden in Chloroform/Methanol/HCl überführt und ein Gemisch aus unmarkierten Inositolphosphat Standards zugegeben. Zwei Proben wurden gepoolt und die mit (^3H) markierten Inositolphosphate wurden nach Extraktion und Separation über HPLC (wie in Abb. 21 gezeigt) gemessen. Die Radioaktivität der einzelnen Phosphatester wurde auf einen Einbau von 10^2 d.p.m. (^3H) Inositol in die entsprechenden Inositolphospholipide bezogen.

Die Daten sind $\text{Mw} \pm \text{SE}$ ($n=3$).

D EINFLUSS VON THROMBOZYTÄREN ARACHIDONSÄURE-
METABOLITEN AUF DIE PHOSPHOLIPASE C-AKTIVIERUNG
UND DIE THROMBOZYTEN-AGGREGATION INDUZIERT DURCH
VASOPRESSIN

Bei höheren Vasopressin-Konzentrationen (10^{-6} M) werden die Arachidonsäure-Metaboliten HHT, 12-HETE und TXB₂ parallel zur irreversiblen Thrombozytenaggregation und Freisetzungsreaktion gebildet.

Mit Indomethazin, welches die Zyklooxygenase hemmt, und BW 755, welches sowohl die Zyklooxygenase als auch die Lipoxygenase hemmt, wurde untersucht, inwieweit Cyclooxygenase- bzw. Lipoxygenase-Produkte die Thrombozytenaggregation und Aktivierung von Phospholipase C beeinflussen können.

Beide Hemmstoffe beeinflussten die initiale Phosphatidsäure- und Arachidonsäurebildung kaum, führten aber zu späteren Zeitpunkten zu deutlicher Reduktion von beiden, während Arachidonsäuremetabolite nicht erscheinen (Abb. 24). Arachidonsäuremetabolite werden nach Präinkubation mit Indometazin bzw. BW 755 nicht gebildet. In Gegenwart dieser Hemmstoffe wurde keine Freisetzung von Serotonin gefunden und es wurde lediglich eine reversible Aggregation beobachtet.

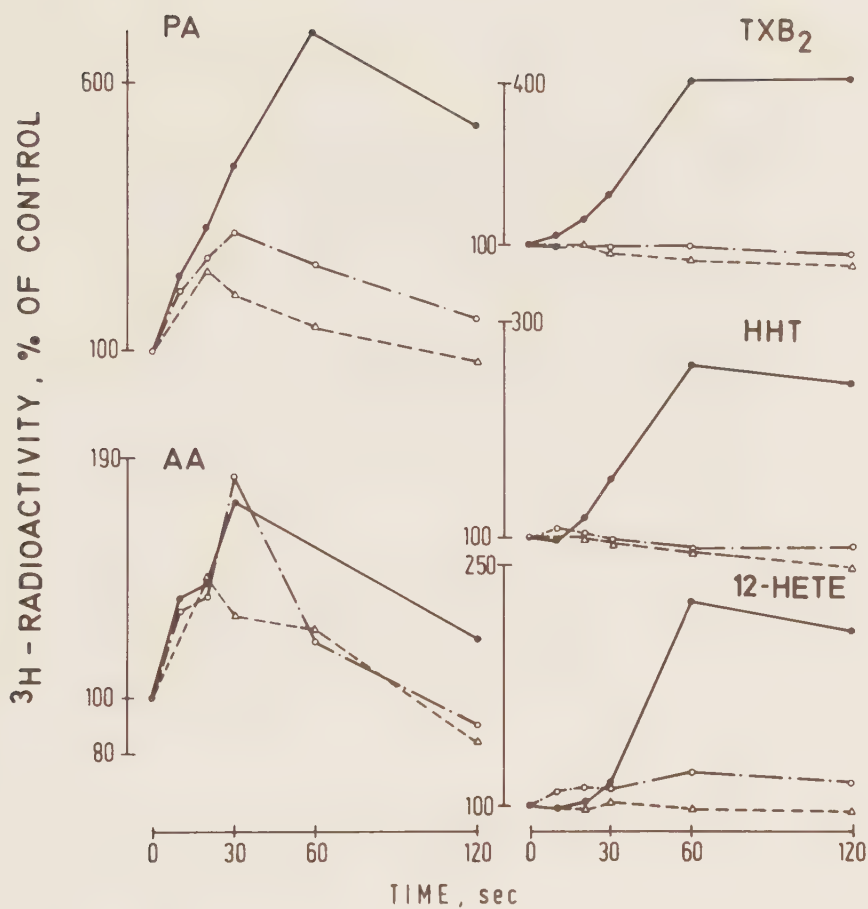


Abb. 24: Effekt von Indomethazin und BW 755 auf die Bildung von Phosphatidsäure und den Arachidonsäure-Metabolismus nach Stimulation mit Vasopressin

Beschreibung Abb. 24:

Menschliche Thrombozyten wurden mit (^3H) Arachidonsäure markiert und bei 37°C drei Minuten mit 0,1 % Äthanol (o—o), Indometazin $10\text{ }\mu\text{M}$ (o--o) oder mit BW 755 $100\text{ }\mu\text{M}$ (▲--▲) inkubiert, bevor Vasopressin $1\text{ }\mu\text{M}$ zugegeben wurde.

Indometazin und BW 755 wurden beide in Äthanol gelöst (0,1% finale Konzentration).

E EINFLUSS VON THROMBOZYTÄR FREIGESETZTEM ADP

Durch die Zugabe von Apyrase wird von den Thrombozyten freigesetztes, aktives ADP abgefangen und inaktiviert. Durch Zugabe von Apyrase konnte eine Verminderung der durch Vasopressin-induzierten Bildung von Phosphatidsäure und der Arachidonsäure-Metabolite gemessen werden.

Bei Apyrase-Konzentrationen von 20 und 40 Units/ml sinkt die Vasopressin-induzierte Bildung der Phosphatidsäure zunehmend, während eine Bildung von Arachidonsäure Metaboliten schon ab einer Apyrase-Konzentration von 20 Units/ml unterbleibt (Abb. 25).

Im Aggregometer zeigte sich bei einer Apyrase-Konzentration von 100 Units/ml nach Stimulation mit Vasopressin ($1\text{ }\mu\text{M}$) eine reversible Aggregation, während sich ohne Apyrase-Zugabe bei Stimulation mit Vasopressin ($1\text{ }\mu\text{M}$) eine irreversible Aggregation zeigte (Abb. 26).

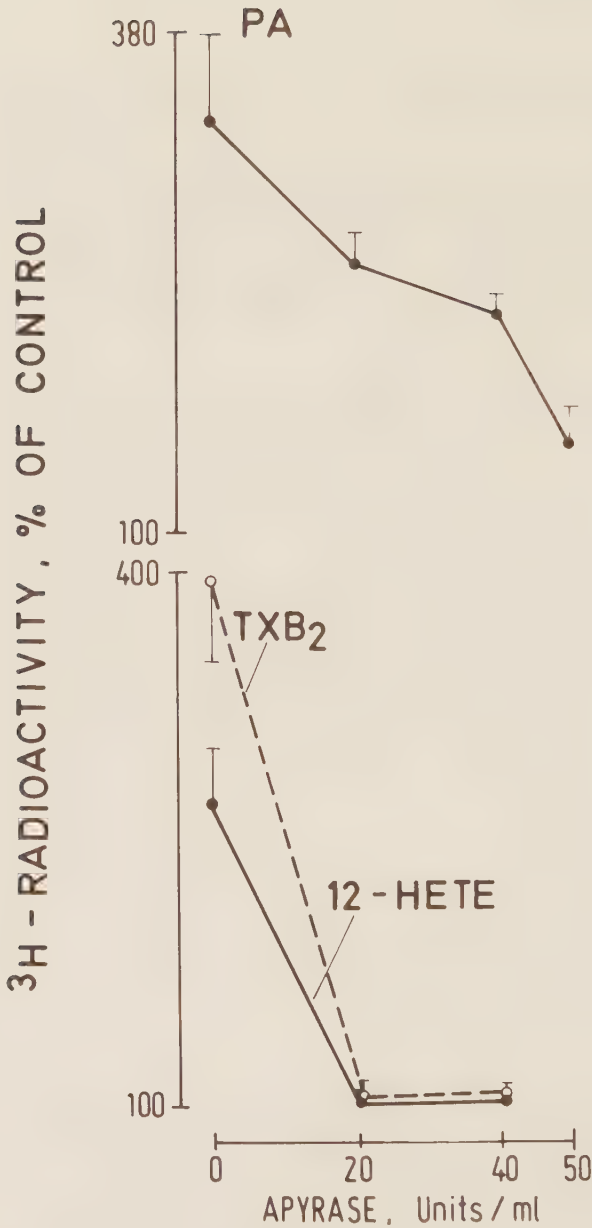


Abb. 25: Effekt von Apyrase auf die Bildung von Phosphatid-säure und Arachidonsäure-Metaboliten nach Stimulation mit Vasopressin.

Beschreibung Abb. 25:

Menschliche Thrombozyten wurden mit (^3H) Arachidonsäure markiert und bei 37°C drei Minuten mit Apyrase (20 und 40 Units/ml) inkubiert, bevor Vasopressin $1\text{ }\mu\text{M}$ zugegeben wurde.

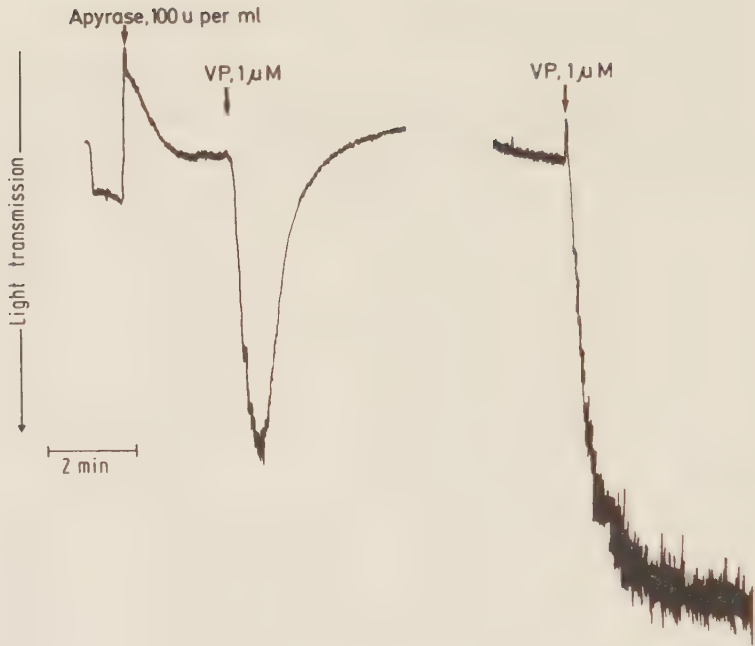


Abb. 26: Aggregationskurven von menschlichem Thrombozytenreichem Plasma nach Stimulation mit Vasopressin unter Zugabe von Apyrase

Thrombozytenreiches Plasma wurde mit Apyrase (100 Units/ml) versetzt und mit Vasopressin ($1 \mu\text{M}$) versetzt (linke Kurve). Zum Vergleich erfolgte eine Stimulation ohne Zugabe von Apyrase (rechte Kurve).

F EINFLUSS EXTRAZELLULÄRER ZWEIWERTIGER KATIONEN

Um den Einfluß von Kalzium und Magnesium zu untersuchen, wurden Chelatoren in Form von Zitrat plus EGTA (für Chelation von extrazellulärem Kalzium) und Zitrat plus EDTA (für Chelationen von Kalzium und Magnesium) zugegeben.

Es zeigte sich, daß die Thrombozyten-Lipidantwort auf Vasopressin von der Anwesenheit von Magnesium nicht aber von Kalzium abhängt. Durch Chelierung von Magnesium und Kalzium mit EDTA wurde der Thrombozyten-stimulierende Effekt von Vasopressin komplett gehemmt (siehe Abb. 18 f und Tabelle 4).

Im Aggregometer zeigte sich keine Aggregation und auch kein typischer shape change.

Reduzierte (durch Zugabe von Zitrat) oder entfernte (durch Zugabe von Zitrat plus EGTA) man lediglich extrazelluläres Kalzium, so wurde nur die Thrombozytenaggregation vermindert bzw. eliminiert, während sich shape change und Lipidantwort nicht signifikant veränderten (siehe Abb. 18 e und Tabelle 4).

Tabelle 4:

Einfluß der Chelierung von extrazellulärem Kalzium und Magnesium auf die Wirkung von Vasopressin auf den Thrombozyten-Lipidstoffwechsel:

Additions	PA	TXB ₂	HHT	HETE	Platelet aggregation (% light transm.)
Vasopressin plus buffer	342 $\pm$ 62	240 $\pm$ 60	230 $\pm$ 9	193 $\pm$ 28	68 $\pm$ 10
Vasopressin plus citrate, 22 mM	239 $\pm$ 19	178 $\pm$ 49	212 $\pm$ 67	192 $\pm$ 35	15 $\pm$ 2
Vasopressin plus citrate, 22 mM, plus EGTA, 5 mM	279 $\pm$ 35	245 $\pm$ 55	203 $\pm$ 28	207 $\pm$ 42	Shape change
Vasopressin plus citrate, 22 mM, plus EDTA, 5 mM	117 $\pm$ 12	106 $\pm$ 5	98 $\pm$ 17	117 $\pm$ 14	No activation

Proben (1,0 ml) von menschlichen Thrombozyten wurden mit (³H) Arachidonsäure prämarkiert, in einem Puffer, der Ca⁺⁺ (0,1 mM) und Mg (1 mM) enthielt, resuspendiert und mit Vasopressin (1 μ M) 1 Minute stimuliert. Für die Chelierung von extrazellulärem Kalzium wurde Zitrat und EGTA drei Minuten vor Vasopressin-Stimulation zugegeben, für die Chelierung von Kalzium und Magnesium Zitrat und EDTA.

Ergebnisse von drei Experimenten wurden als % der Kontrolle (keine Zugabe von Vasopressin) angegeben (Mw $\pm$ SE).

G EINFLUSS VON REZEPTOR-BLOCKERN
VASOPRESSIN AKTIVIERT IN THROMBOZYTEN DEN
 V_1 -REZEPTOR

Wurden die Thrombozyten mit 100 nM eines spezifischen V_1 -Rezeptor-Antagonisten $d(CH_2)_5Tyr(Me)AVP$ (79) vorinkubiert, so wurde die Wirkung von Vasopressin auf die Thrombozytenantwort und die Bildung von Inositol-Phosphaten total unterdrückt (siehe Abb. 18c und Tabelle 5).

Der V_1 -Rezeptor-Antagonist verhindert dosisabhängig die Bildung von Phosphatidsäure in Thrombozyten, die mit Vasopressin stimuliert wurden.

Der ID_{50} (siehe Abb. 27) lag zwischen 0,1 und 1 nM.

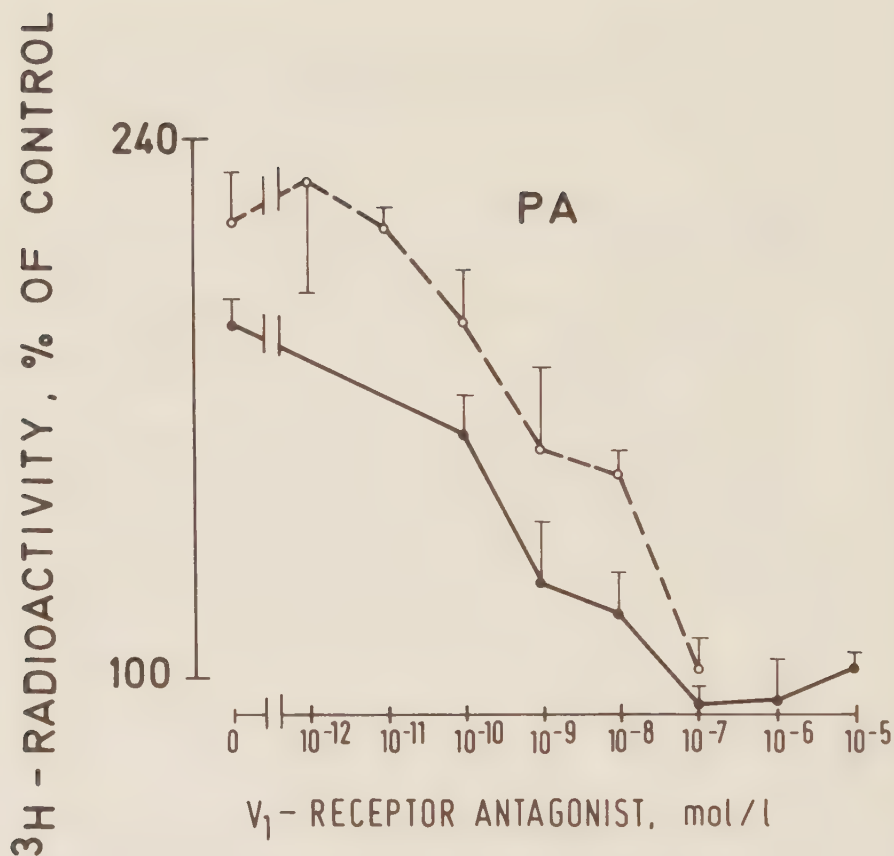


Abb. 27: Effekt verschiedener Konzentrationen des V₁-Rezeptor-Antagonisten d(CH₂)₅Tyr(Me)AVP auf die Bildung von Phosphatidsäure nach Vasopressin-Stimulation

Menschliche Thrombozyten wurden mit (³H) Arachidonsäure markiert und mit verschiedenen Konzentrationen von d(CH₂)₅Tyr(Me)AVP bei 37°C 2 Minuten inkubiert, bevor eine Inkubation von 1 Minute mit Vasopressin (1 μM) erfolgte. Die Daten sind von zwei Einzelexperimenten (●—●, ○---○) verschiedener Thrombozytenspender.

Tabelle 5: Effekt von DDAVP auf die Bildung von Inositolphosphaten und von Indomethazin oder V_1 -Rezeptor Antagonist auf die durch Vasopressin stimulierte Bildung von Inositolphosphaten in menschlichen Thrombozyten.

Zugabe	Glycero-phospho-inositol	Inositol 1-phosphat	Inositol 4-phosphat	dpm 3H -Radioaktivität		
Keine	2023 2234	869 880	669 763	228 209	Inositol 1,4-bis-phosphat	Inositol 1,4,5-tris-phosphat
Vasopressin, 1 μM	1958 2654	2156 1915	2189 2010	1380 1176		507 555
Vasopressin, 1 μM plus Indomethacin, 10 μM	2302 1995	2019 2134	2056 1804	1183 1109		486 455
Vasopressin, 1 μM plus V_1 -Rezeptor Antagonist 100 nM	2615 2091	858 904	747 856	245 228		39 100
DDAVP, 1 μM	2239 2041	747 856	634 747	235 180		47 58

Menschliche Thrombozyten wurden mit (3H) Inositol markiert und 1 Minute mit Vasopressin oder DDAVP inkubiert. Der V_1 -Rezeptor Antagonist $d(CH_2)_5Tyr(Me)AVP$ oder Indomethazin wurden drei Minuten vor der Vasopressin-Zugabe zugesetzt. Radioaktive Inositolphosphate wurden wie in Abb. 21 nach HPLC gemessen.

VI. DISKUSSION

A METHODIK

Um biochemische Studien an Thrombozyten in der beschriebenen Weise durchführen zu können, war es nötig, verschiedene Thrombozyten Kompartimente entweder mit (^3H) Arachidonsäure oder (^3H) Inositol radioaktiv zu markieren.

Für die Messung des Inositolphospholipid-Stoffwechsels in Thrombozyten mit Vasopressin als Agonist mußten die Thrombozyten in einer Weise markiert und gewaschen werden, daß die Vasopressin-Antwort nicht verloren ging. Als Wasch- und Resuspensionspuffer verwendeten wir Tyrodes-Hepes-Puffer. Eine Thrombozytenaktivierung während des Wasch- und Resuspensionsvorganges wurde durch Zugabe von Prostazyklin, Heparin und Apyrase verhindert.

Die ständige Gegenwart von Magnesium im Puffer war notwendig. Die gewaschenen und prämarkierten Thrombozyten zeigten die gleiche Reaktion auf Vasopressin wie das plättchenreiche Plasma (siehe Abb. 16, 17).

B EINFLUSS VON VASOPRESSIN AUF DEN INOSITOLPHOSPHOLIPID-STOFFWECHSEL (DIAZYLGLYZEROL, PHOSPHATIDSÄURE UND INOSITOLPHOSPHATE)

Die Wirkung von Vasopressin auf den Inositolphospholipid-Stoffwechsel wurde bisher hauptsächlich in He-

patozyten (3-11), jedoch noch nicht in Thrombozyten untersucht.

Werden die V_1 -Rezeptoren der Thrombozyten durch Vasopressin ($0,01-1 \mu\text{M}$) stimuliert, dann kommt es durch Aktivierung von Phospholipase C zur Hydrolyse von Inositolphospholipiden und zur schnellen Bildung von 1,2-Diazylglyzerol, Phosphatidsäure und verschiedenen Inositolphosphaten, welche von uns gemessen wurden.

Als erste Produkte 5 Sekunden nach Vasopressin-Stimulation konnten Inositolbis- und -trisphosphat gemessen werden, Inositol-Monophosphate erschienen erst 10 Sekunden später. Während die Inositol-Monophosphate Inositol 1-monophosphat und Inositol 4-monophosphat kontinuierlich akkumulierten, kam es nur zu einem vorübergehenden Anstieg von Inositol Bis- und Trisphosphat.

Dies führte uns zu dem Schluß, daß die Monophosphate zumindest zum Teil durch Degradation von Inositol bis- und trisphosphaten über spezifische Phosphomonoesterasen gebildet werden.

Eine Spaltung des Inositol 1,4-Bisphosphates durch Phosphatasen ließ die Bildung eines Gemisches aus Inositol 1-monophosphat und Inositol 4-monophosphat vermuten, was unsere Messungen dann bestätigten. Die beiden Monophosphate fanden sich in nahezu gleichen Mengen. Auch in Leberzellen konnte keine genaue Positionsselektivität der löslichen Phosphatase für Inositol 1,4-bisphosphat bezüglich der 1- oder 4-Position der Phosphatgruppen am Inositolring gefunden werden (106).

Diese Daten lassen zwar vermuten, daß Inositol Monophosphate in mit Vasopressin stimulierten Thrombozyten fast vollständig aus Inositol Bisphosphat gebildet werden, jedoch sollte die Möglichkeit einer Hydrolyse von Phosphatidylinositol durch Phospholipase C nicht außer acht gelassen werden.

Phosphatidylinositol 4-phosphat und Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat werden beide durch Phospholipase C gespalten, so daß auch eine Bildung von Inositol 1,4-bisphosphat aus Phosphatidylinositol 4-monophosphat möglich wäre.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß nur Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat initial degradiert wird und Inositol 1,4-bisphosphat anstatt aus Phosphatidylinositol 4-phosphat aus Inositol 1,4,5-trisphosphat gebildet wird. Hinweise für diese Vermutung liefern Beobachtungen, daß mit ^{32}P -markiertes Phosphatidylinositol 4-phosphat nach Stimulation mit Thrombin und Endoperoxid-Analogen nicht abnimmt (99, 104).

Die Bildung von Inositolpolyphosphaten vor der Akkumulation von Inositolmonophosphaten wurde auch in Hepatozyten nach Vasopressin-Stimulation (11) und nach Thrombozyten-Stimulation mit Thrombin, Kollagen und Endoperoxid-Analogen beschrieben (102, 105).

C EINFLUSS VON THROMBOZYTÄR GEBILDETEN ARACHIDON-SÄURE-METABOLITEN, FREIGESETZTEM ADP UND EXTRA-ZELLULÄREN KALZIUM- UND MAGNESIUM-IONEN

Wie nach der Stimulation von Thrombozyten mit niedrigen Konzentrationen von Thrombin, Plättchen-stimulierendem Faktor und Endoperoxid-Analogen (26-29) zeigte sich eine deutliche Dissoziation von Phospholipase C-Aktivierung und Arachidonsäure-Metabolismus während des shape changes und der reversiblen Aggregation nach Stimulation mit Vasopressin.

Jede physiologische Thrombozyten-Aktivierung in Form von shape change oder Aggregation scheint mit der Aktivierung von Phospholipase C gekoppelt zu sein:

- Shape change und reversible Aggregation zeigten eine Phospholipase C-Aktivierung und eine Erhöhung der freien Arachidonsäure.
- Irreversible Aggregation eine weitere Aktivierung der Phospholipase C und Arachidonsäure-Metaboliten.

Warum im ersten Fall keine Arachidonsäure-Metabolite entstehen, ist unklar. Eine stärkere Aktivierung der Phospholipase C während der Freisetzungsreaktion und irreversiblen Aggregation wird wahrscheinlich durch die Endoperoxide, Thromboxan A_2 und ADP vermittelt.

Die Frage, welche Rolle der Arachidonsäure-Metabolismus bei der Thrombozytenaktivierung spielt und wann Zyklooxygenase- und Lipoxygenase-Produkte erscheinen, schloß sich an.

Lapetina und Siess(26, 27) konnten schon 1983 zeigen, daß thrombozytär gebildete Endoperoxide und Thromboxan A_2 als Feed-back-Promoter wirken, das heißt, daß sie über eine weitere Stimulation der Phospholipase C zu einer Beschleunigung und Verstärkung der Thrombozytenantwort führen. Für Thrombin wurde dieser Amplifikations-Mechanismus nur für mittlere Konzentrationen gefunden, während bei Kollagen eine starke Abhängigkeit davon besteht (26).

In unseren Versuchen mit Vasopressin kam es bei höheren Vasopressin-Konzentrationen ($1 \mu M$) zusätzlich zur Bildung von Arachidonsäure-Metaboliten. Das Erscheinen von Zyklooxygenase- und Lipoxygenase-Produkten war mit einer weiteren Aktivierung von Phospholipase C, einer irreversiblen Aggregation und Freisetzungsreaktion verbunden.

Endoperoxiden und Thromboxan A_2 dürfte somit auch bei der Stimulation mit Vasopressin eine Verstärkerfunktion zuzuordnen sein.

Wurde zum Beispiel durch Indomethazin die Zyklooxygenase oder durch BW 755 zusätzlich noch die Lipoxygenase gehemmt, so konnte kaum eine Beeinflussung der initialen Phosphatidsäure- und Arachidonsäure-Bildung beobachtet werden. Zu späteren Zeitpunkten kam es jedoch zu einer deutlichen Reduktion von beiden. In Gegenwart dieser Hemmstoffe kam es lediglich zu einer reversiblen Aggregation.

Neben oben genanntem Amplifikationsmechanismus existiert noch ein weiterer:

Dieser wird über ADP, welches aus den dichten Granula freigesetzt wird, vermittelt. Wenn in unserem Experiment freigesetztes ADP durch Zugabe von Apyrase abgefangen wurde, so wurde durch diese ADP-Inaktivierung die Bildung von Phosphatidsäure vermindert (siehe Abb. 25). Dieser Abfall der Phosphatidsäure könnte möglicherweise durch eine Hemmung der Bildung von Endoperoxiden bedingt sein, wobei unklar ist, warum Apyrase die Bildung der Arachidonsäuremetaboliten hemmt.

Mit den bisher untersuchten Stimuli Thrombin, Arachidonsäure, Plättchen-stimulierendem Faktor und Endoperoxiden konnten shape change und Phospholipase C-Aktivierung unabhängig von extrazellulärem Kalzium und Magnesium ausgelöst werden (27-29, 34). In unseren Experimenten zeigte sich, daß der Vasopressin-Effekt von extrazellulärem Kalzium unabhängig, jedoch von Magnesium abhängig ist (siehe Abb. 18 e, f und Tabelle 4). Möglicherweise wird Magnesium zur Bindung von Vasopressin an seinen Rezeptor benötigt.

D SECOND MESSENGER:

Die zeitliche Reihenfolge des Erscheinens der verschiedenen Inositolphospholipide interessierte uns im Hinblick auf die Möglichkeit von second messenger-Funktionen. Da Inositol 1,4,5-trisphosphat und 1,2-Diazylglyzerol relativ rasch direkt nach der Thrombozytenstimulation mit Vasopressin erscheinen, könnten sie als second messenger in Frage kommen. Dabei akti-

viert 1,2-Diazylglyzerol wahrscheinlich eine Proteinkinase C, die für die Phosphorylierung eines endogenen Proteins mit dem Molekulargewicht von 40 000 verantwortlich ist (35).

Das 40 K Protein ist ein Substrat der Proteinkinase C, seine Funktion ist bisher nicht bekannt. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß Proteinkinase C interessanterweise auch durch tumor-promoting Phorbol-ester aktiviert wird und spezifische zelluläre Proteine phosphoryliert (35).

Neben 1,2-Diazylglyzerol könnte Inositol 1,4,5-trisphosphat eine second messenger Funktion übernehmen, indem es möglicherweise das Verbindungsglied vom Rezeptor auf der Membranoberfläche und den intrazellulären Kalziumspeichern bildet (3-11, 35-37).

Die Kalzium freisetzende Wirkung von Inositol 1,4,5-trisphosphat wurde zuerst in Präparationen von pankreatischen Azinuszellen von Ratten studiert (36). Es zeigte sich, daß Inositol 1,4,5-trisphosphat wahrscheinlich nur das Kalzium des Endoplasmatischen Retikulums nicht aber das mitochondriale freisetzen kann (37).

Hallam et al. fanden bei Vasopressin-Stimulation von Thrombozyten, daß die zytosolische Kalzium-Erhöhung zum Teil durch eine Mobilisierung von Kalzium aus intrazellulären Speichern, zum Teil durch einen Kalzium-Einstrom von außen bewirkt wird (32). Für diesen Einstrom von außen könnte Phosphatidsäure verantwortlich sein, was in neueren Arbeiten mit Plättchen-stimulierendem Faktor nahegelegt wurde (91).

Da die Phosphatidsäure in der Membran lokalisiert ist könnte sie den Kalzium-Einstrom oder eine Assoziation von Kalzium an die Thrombozytenoberfläche bewirken (91, 92).

Das wasserlösliche Inositol 1,4,5-trisphosphat könnte dagegen von der Plasma-Membran zum Endoplasmatischen Retikulum wandern und dort Kalzium freisetzen (siehe Abb. 15). Neben der Phosphorylierung eines 40 K Proteins kommt es in Gegenwart von Kalzium und in Abhängigkeit von Calmodulin zur Phosphorylierung eines weiteren Proteins, des 20 K Proteins.

Das 20 K Protein stellt die Myosin light chain dar. Die Phosphorylierung der Myosin light chain aktiviert Myosin in der Weise, daß es mit Aktin-Filamenten interagiert und eine ATP-ase Aktivität entwickelt.

Diese Vorgänge stehen in direktem Zusammenhang mit den kontraktile Prozessen, die während des Thrombozyten shape change und der Freisetzungsreaktion stattfinden (siehe Abb. 15).

Auch konnte in intakten Thrombozyten eine Phospholipase C-Aktivierung ohne gleichzeitige Kalzium-Mobilisierung, somit unabhängig von einer intrazellulären Kalzium-Mobilisierung gefunden werden, während in vitro Phospholipase C durch Kalzium aktiviert wird.

Der allgemeine Kopplungsmechanismus von aktiviertem

V₁-Rezeptor und Phospholipase C ist unklar. Allgemein zeigte sich jedoch, daß nur Agonisten, die eine Rezeptoraktivierung bewirken, auch die Phospholipase C stimulieren. Agonisten ohne Rezeptor-Stimulation wie zum Beispiel Kalzium-ionophore A 23187 und Ionomycin zeigen keine Phospholipase C-Aktivierung (104).

E KORRELATION VON INOSITOLPHOSPHOLIPID-HYDROLYSE UND THROMBOZYTENFUNKTION

Bereits in früheren Arbeiten konnte ein Zusammenhang zwischen den physiologischen Thrombozytenantworten und bestimmten Phospholipid-Veränderungen beobachtet werden (26, 33, 34). Bisher wurden als Agonisten Kollagen, Thrombin, Arachidonsäure, Plättchen-stimulierender Faktor und Prostaglandin-Endoperoxide verwendet.

Die Wirkung von Vasopressin auf den Phospholipid-Stoffwechsel der Thrombozyten ist bisher nicht untersucht worden. Simultane Messung der funktionellen Thrombozytenantworten und Änderung der mit (³H) Arachidonsäure markierten Thrombozytenlipide zeigte folgendes:

Der Effekt von Vasopressin auf den Thrombozytenstoffwechsel war konzentrationsabhängig. Niedrige Konzentrationen von Vasopressin (10^{-9} M, 10^{-8} M) induzierten shape change und die Bildung von 1,2-Diazylglycerol, Phosphatidsäure und eine geringe Erhöhung der

Arachidonsäure über eine Aktivierung der Phospholipase C. Zyklooxygenase- und Lipoxygenase-Produkte entstehen bei diesen Konzentrationen nicht. Bei höheren Konzentrationen (10^{-7} M) kam es zu einer reversiblen, bei noch höheren (10^{-6} M) zu einer irreversiblen Aggregation und Freisetzungsreaktion.

Erst die irreversible Aggregation war mit einem deutlichen Anstieg von Arachidonsäure und der Bildung der Arachidonsäure-Metaboliten verbunden.

F REZEPTORZUORDNUNG

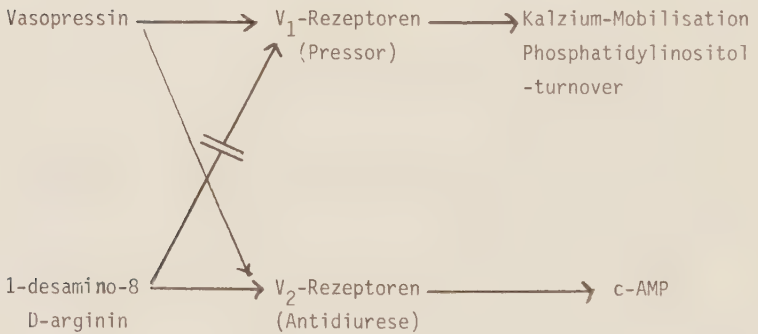
Um der Frage nachzugehen, welcher Vasopressin-Rezeptor aktiviert wird, verwendeten wir V_1 - und V_2 -Rezeptor-Agonisten und einen V_1 -Rezeptor-Antagonisten.

Das hier verwendete (Lys)Vasopressin bindet und aktiviert sowohl V_1 - als auch V_2 -Rezeptoren. Stimulation mit dem V_2 -Rezeptor Agonisten 1-desamino-8 D-arginin, der noch eine schwache V_1 -antagonistische Wirkung besitzt, führte weder zu einer meßbaren physiologischen Thrombozytenantwort, noch zu Veränderungen im Phospholipidstoffwechsel.

Eine signifikante Bildung von 1,2-Diazylglycerol, Phosphatidsäure, Arachidonsäure und Inositolphosphat konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 19 und Tabelle 5).

Bei Vorbehandlung der Thrombozyten mit dem V_1 -Rezeptor Antagonisten $d(CH_2)_5Tyr(Me)AVP$ wurde die Vasopressin-Wirkung dosisabhängig total blockiert (siehe Abb. 18c, 27 und Tabelle 5).

Diese Resultate ebenso wie Arbeiten von Thomas, Osmani und Scrutton (20) lassen vermuten, daß Thrombozyten V_1 -Rezeptoren besitzen.



VII. ZUSAMMENFASSUNG

Die Vermutung, daß Vasopressin in Thrombozyten sehr wahrscheinlich über eine Aktivierung von V_1 -Rezeptoren zu Aggregation und Freisetzungsreaktion führt, konnte durch unsere Untersuchungen erhärtet werden. Die beschriebenen Thrombozytenveränderungen konnten zum Beispiel nicht durch DDAVP, einem V_2 -Rezeptor Agonisten, hervorgerufen werden, und sie konnten durch einen V_1 -Rezeptor Antagonisten blockiert werden. Vasopressin benötigte für seine Wirkung extrazelluläre Magnesium-Ionen, jedoch kein Kalzium.

Es konnte gezeigt werden, daß Vasopressin vergleichbar einer Reihe anderer Thrombozyten-Agonisten (Thrombin, Kollagen, Platelet-activating Factor, Arachidonsäure und Prostaglandin Endoperoxid-Analogen) ist und in Thrombozyten eine Hydrolyse von Inositol-Phospholipiden hervorruft.

Zwischen dieser durch Phospholipase C induzierten Inositol-Phospholipid-Hydrolyse und Thrombozytenfunktionsänderungen konnte eine enge Korrelation beobachtet werden.

Niedrige Vasopressin-Konzentrationen ($1-100 \mu\text{M}$) induzieren shape change und reversible Aggregation und aktivieren nur die Phospholipase C. Höhere Vasopressin-Konzentrationen ($1 \mu\text{M}$) induzieren eine stärkere Phospholipase C-Aktivierung und die Bildung von Arachidonsäure-Metaboliten. Die Bildung von Zykllooxygenase-Produkten verursacht eine weitere Phospholipase C-Aktivierung, Freisetzungsreaktion und irreversible Aggregation.

Prostaglandin Endoperoxide und Thromboxan B₂ bilden für die Thrombozyten Aktivierung einen Amplifikationsmechanismus.

Wurden Thrombozyten mit Vasopressin (0,01 - 1 μ M) stimuliert, so konnte eine schnelle Bildung von 1,2-Diazylglyzerol und Inositol 1,4,5-Trisphosphat gemessen werden, die durch hydrolytische Spaltung von Inositolphospholipiden entstehen. Nach dem heutigen Stand der Forschung können folgende zwei second messenger vermutet werden:

1,2-Diazylglyzerol aktiviert Proteinkinase C und Inositol 1,4,5-Trisphosphat mobilisiert Kalzium aus dem Endoplasmatischen Retikulum.

Bei der Messung der verschiedenen Inositolphosphate konnte ein Anstieg von Inositol 4-Phosphat und Inositol 1-Phosphat erst nach der Bildung von Inositol 1,4-Bisphosphat und Inositol 1,4,5-Trisphosphat gemessen werden. Inositol 4-Monophosphat entstand sehr wahrscheinlich aus Inositol 1,4-Bisphosphat, es könnte somit bei weiteren Untersuchungen des Inositolphospholipid-Stoffwechsels die Rolle eines Marker-Moleküls übernehmen.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Michell, R.H., Kirk, C.J., and Billah, M.M.:
 Hormonal Stimulation of phosphatidylinositol
 breakdown with particular reference to the hepatic
 effects of vasopressin.
 Biochem. Soc. Trans., 7. 861-865, 1979.
- 2 Crause, P., Boer, R., and Fahrenholz, F.:
 Determination of the functional molecular size
 of vasopressin isoreceptors.
 FEBS Lett. 175, 2, 383-386, 1984.
- 3 Kirk, Ch. J., Verrinder, T.R., and Hems D.A.:
 Rapid Stimulation, by Vasopressin and Adrenaline,
 of Inorganic Phosphate incorporation into Phospha-
 tidyl Inositol in isolated hepatocytes.
 FEBS Lett. 83, 2, 267-271, 1977.
- 4 Billah, M.M., and Michell, R.H.:
 Phosphadidylinositol Metabolism in Rat Hepato-
 cytes Stimulated by Glycogenolytic Hormones.
 Biochem. J. 182, 661-668, 1979.
- 5 Kirk, Ch.J., Michell, R.H., and Hems, D.A.:
 Phosphatidylinositol metabolism in rat hepato-
 cytes stimulated by vasopressin.
 Biochem. J. 194, 155-165, 1981.
- 6 Michell, R.H., Kirk, C.J., Jones, L.M., Downes,
 C.P., and Creba, J.A.:
 The stimulation of inositol lipidmetabolism that
 accompanies calcium mobilization in stimulated
 cells: defined characteristics and unanswered
 questions. Phil. Trans. R. Soc. B 296, 123-137,
 1981.

- 7 Prpic, V., Blackmore, P.F., and Exton, J.H.:
Phosphatidylinositol Breakdown Induced by
Vasopressin and Epinephrine in Hepatocytes Is
Calcium-dependent.
J. Biol. Chem. 257, 19, 11323-11331, 1982.
- 8 Thomas, A.P., Marks, J.S., Coll, K.E., and
Williamson, J.R.:
Quantitation and Early Kinetics of Inositol
Lipid Changes Induced by Vasopressin in Isolated
and Cultured Hepatocytes.
J. Biol. Chem. 258, 9, 5716-5725, 1983.
- 9 Litosch, I., Lin, S.H., and Fain, J.N.:
Rapid Changes in Hepatocyte Phosphoinositides
Induced by Vasopressin.
J. Biol. Chem. 258, 22, 13727-13732, 1983.
- 10 Burgess, G.M., Godfrey, P.P., McKinney, J.S.,
Berridge, M.J., Irvine, R.F., and Putney, J.W.:
The second messenger Ca^{2+} linking receptor activa-
tion to internal Ca release in liver.
Nature 309, 63-66, 1984.
- 11 Thomas, A.P., Alexander, J., and Williamson, J.R.:
Relationship between Inositol Polyphosphate
Production and the Increase of Cytosolic Free
 Ca^{2+} Induced by Vasopressin in Isolated Hepato-
cytes.
J. Biol. Chem. 259, 9, 5574-5584, 1984.
- 12 Butlen, D., Guillon, G., Rajerison, R.M., Jard,
S., Sawyer, W.H., and Manning, M.:
Structural requirements for activation of vaso-

- pressin-sensitive adenylate cyclase and hormone binding: effects of highly potent antidiuretic analogues and competitive inhibitors.
Mol. Pharmacol. 14, 1006-1017, 1978.
- 13 Hassid, A., and Williams, Ch.:
Vasoconstrictor-evoked prostaglandin synthesis in cultured vascular smooth muscle.
Am. J. Physiol. 245, C278-C282, 1983.
- 14 Chong, K.P., Burch, R.M., Black, M., Maloney, E., Jollow, D.J., and Halushka, P.V.:
Vasopressin stimulated thromboxane synthesis in isolated hamster hepatocytes: Relation to hepatocyte calcium content.
Prostaglandins 26, 3, 397-408, 1983.
- 15 Pfeilschifter, J., Kurtz, A., and Bauer, Ch.:
Activation of phospholipase C and prostaglandin synthesis by (arginine) vasopressin in cultures.
Biochem. J. 223, 855-859, 1984.
- 16 Lieberthal, W., and Levine, L.:
Stimulation of prostaglandin production in rat glomerular epithelial cells by antidiuretic hormones.
Kidney Int. 25, 776-780, 1984.
- 17 Ausiello, D.A., and Zusman, R.M.:
The role of calcium in the stimulation of prostaglandin synthesis by vasopressin in rabbit renal-medullary interstitial cells in tissue culture.
Biochem. J. 220, 139-145, 1984.

- 18 Vicentini, L.M., and Villereal, M.L.:
 Serum, Bradykinin And Vasopressin Stimulate Release of Inositol Phosphates From Human Fibroblasts.
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 123, 663-670, 1984.

- 19 Haslam, R.J., and Rosson, G.M.:
 Aggregation of human blood platelets by vasopressin.
 Am. J. Physiol. 223, 958-967, 1972.

- 20 Thomas, M.E., Osmani, A.H., and Scrutton, M.C.:
 Some properties of the human platelet vasopressin-receptor.
 Thromb. Res. 32, 557-566, 1983.

- 21 Vanderwel, M., Lum, D.S., and Haslam, R.J.:
 Vasopressin inhibits the adenylate cyclase activity of human platelet particulate fraction through V_1 -receptors.
 FEBS Lett. 164, 2, 340-344, 1983.

- 22 Lapetina, E.G., and Cuatrecasas, P.:
 Stimulation of phosphatidic acid production in platelets precedes the formation of arachidonic acid and parallels the release of serotonin.
 Biochim. Biophys. Acta 573, 394-402, 1983.

- 23 Rittenhouse-Simmons, S.:
 Production of diglyceride from phosphatidylinositol in activated human platelets.
 J. Clin. Invest. 63, 580-597, 1979.

- 24 Broekman, M.J., Ward, J.W., and Marcus, A.J.:
Phospholipid Metabolism in Stimulated Human Platelets. Changes in Phosphatidylinositol, Phosphatidic acid, and Lysophospholipids.
J. Clin. Invest. 66, 275-283, 1980.

- 25 Lapetina, E.G.:
Platelet-activating Factor Stimulates the Phosphatidylinositol Cycle. Appearance of phosphatidic acid is associated with the release of serotonin in horse platelets.
J. Biol. Chem. 257, 7314-7317, 1982.

- 26 Siess, W., Cuatrecasas, P., and Lapetina, E.G.:
A Role for Cyclooxygenase Products in the Formation of Phosphatidic Acid in Stimulated Human Platelets.
J. Biol. Chem. 258, 4683-4686, 1983.

- 27 Siess, W., Siegel, F.L., and Lapetina, E.G.:
Arachidonic Acid stimulates the formation of 1,2-Diacylglycerol and phosphatidic acid in human platelets. Degree of phospholipase C activation correlates with protein phosphorylation, platelet shape change, serotonin release, and aggregation.
J. Biol. Chem. 258, 11236-11242, 1983.

- 28 Siess, W., Siegel, F.L., and Lapetina, E.G.:
Dihomogammalinolenic acid, but not Eicosapentaenoic acid, activates washed human platelets.
Biochim. Biophys. Acta 801, 265-276, 1984.

- 29 Siess, W., Boehlig, B., Weber, P.C., and Lapetina, E.G.:
Prostaglandin endoperoxide analogues stimulate phospholipase C and protein phosphorylation during platelet shape change.
Blood 65, 1141-1148, 1985.
- 30 Rink, T.J., Smith, S.W., and Tsien, R.Y.:
Cytoplasmic free Ca^{2+} in human platelets: Ca^{2+} thresholds and Ca-independent activation for shape change and secretion.
FEBS Lett 148, 1, 21-26, 1982.
- 31 Rink, T.J., Sanchez, A., and Hallam, T.J.:
Diacylglycerol and phorbol ester stimulate secretion without raising cytoplasmic free calcium in human platelets.
Nature 305, 317-319, 1983.
- 32 Hallam, T.J., Sanchez, A., and Rink, T.J.:
Stimulus-response coupling in human platelets. Changes evoked by platelet-activating factor in cytoplasmic free calcium monitored with the fluorescent calcium indicator quin 2.
Biochem. J. 218, 819-827, 1984.
- 33 Siess, W., and Lapetina, E.G.:
The role of phospholipase C in platelet responses.
Life Sci. 33, 1011-1018, 1983.
- 34 Siess, W., Weber, P.C., and Lapetina, E.G.:
Activation of Phospholipase C is Dissociated from Arachidonate Metabolism during Platelet

Shape Change Induced by Thrombin or Platelet-activating Factor.

Epinephrine does not induce phospholipase C activation or platelet shape change.

J. Biol. Chem. 259, 8286-8292, 1984.

- 35 Nishizuka, Y.:
The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion.
Nature 308, 693-698, 1984.
- 36 Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J., and Schulz, I.:
Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate.
Nature 306, 67-69, 1983.
- 37 Berridge, M.J., and Irvine, R.F.:
Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction.
Nature 312, 315-321, 1984.
- 38 Hallam, T.J., Thompson, N.T., Scrutton, M.C., and Rink, T.J.:
The role of cytoplasmic calcium in the responses of quin2-loaded human platelets to vasopressin.
Biochem. J. 221, 897-901, 1984.
- 39 Du Vigneaud, V.:
The isolation and proof of structure of the vasopressins and the synthesis of octa peptide amides with pressor-antidiuretic activity.

- In: Proceedings of the Third International Congress of Biochemistry, Brussels, 1956, p. 49.
Edited by Liebecq, G., New York, 1955, Academic Press, Inc.
- 40 Du Vigneaud, V., Gish, D.T., Katsoyannis, P.G., and Hess, G.P.:
Synthesis of pressor-antidiuretic hormone, arginin-vasopressin.
J.Am.Chem.Soc. 80, 3355, 1958.
- 41 Scherbaum, W.A.:
Neue Erkenntnisse zur Ausschüttung und Wirkung von Vasopressin und Oxytocin.
Deutsche Med.Wchschr.(Nr. 51/52, Sonderdruck), 108, 1970-1975, 1983.
- 42 Schmale, H., and Richter, D.:
Immunological identification of a common precursor to arginin vasopressin and neurophysin II synthesized by in vivo translation of bovine hypothalamic m RNA.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 78, 766, 1981.
- 43 Land, H., Schütz, G., Schmale, H., and Richter, D.:
Nucleotide sequence of cloned cDNA encoding bovine arginin vasopressin-neurophysin II precursor.
Nature 295, 299, 1982.
- 44 Buijjs, R.M.:
Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat.

- Cell Tissue Res. 129, 423, 1978.
- 45 Buijjs, R.M., and van Heerikhuize, J.J.:
Vasopressin and oxytocin release in the brain-
a synaptic event.
Brain Res. 252, 71, 1982.
- 46 Hanley, M.R., Hilary, P.B., and Lightman, S.L.:
A vasopressin-like peptide in the mammalian
sympathetic nervous system.
Nature 309, 258-261, 1984.
- 47 Browstein, M.J., Russell, J.T., and Gainer, H.:
Synthesis, transport, and release of posterior
pituitary hormones.
Science 207, 373-378, 1980.
- 48 Altura, B.M., and Altura, B.T.:
Actions of vasopressin, oxytocin, and synthetic
analogs on vascular smooth muscle.
Fed. Proc. 43, 80-86, 1984.
- 49 Liard, J.F.:
Vasopressin in cardiovascular control: role
of circulating vasopressin.
Clin. Sci. 87, 473-481, 1984.
- 50 Glanzer, K., Prussing, B., Düsing, R., and
Kramer, J.H.:
Hemodynamic and hormonal responses to 8-argi-
nine-vasopressin in healthy man: effect of
indomethacin.
Klin. Wschr. 60, 1234-1239, 1982.

- 51 Montani, J.P., Liard, J.F., Schoun, J., and Möhring, J.:
Hemodynamic effects of exogenous and endogenous vasopressin at low plasma concentrations in conscious dogs.
Circulation Research 47, 346-355, 1980.
- 52 Laycock, J.F., Penn, W., Shirley, D.G., and Walter, S.J.:
The role of vasopressin in blood pressure regulation immediately following acute haemorrhage in the rat.
J. Physiol. (London) 296, 267-275, 1979.
- 53 Zerbe, R.L., Bayorh, M.A., and Feuerstein, G.:
Vasopressin: an essential pressor factor for blood pressure recovery following haemorrhage.
Peptides 3, 509-514, 1982.
- 54 Crofton, J.T., Share, L., Shade, R.E., Lee-Kwon, W.J., Manning, M., and Sawyer, W.:
The importance of vasopressin in the development and maintenance of DOC-salt hypertension in the rat.
Hypertension 1, 31-38, 1979.
- 55 Okuno, T., Winternitz, S.R., Lindheimer, M.D., and Oparil, S.:
Central catecholamine depletion, vasopressin, and blood pressure in the DOCA/NaCl rat.
Am. J. Physiol. 244, H807-H813, 1983.
- 56 Swanson, L.W.:
Immunohistochemical evidence for a neuro-

- physin-containing autonomic pathway arising in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.
Brain Res. 128, 346-353, 1977.
- 57 Tran, L.D., Montastruc, J.L., and Montastruc, P.:
Effects of lysine-vasopressin and oxytocin on central cardiovascular control.
Br. J. Pharmacol. 77, 69-73, 1983.
- 58 De Wied, D.:
The influence of posterior and intermediate lobe of the pituitary peptides on the maintenance of conditioned avoidance response in rats.
Int. J. Neuropharmacol. 4, 157, 1965
- 59 De Wied, D., and Bohus, B.:
Memory deficit in rats with hereditary diabetes insipidus.
Brain Res. 85, 152, 1975.
- 60 Blake, D.R., Dodd, M.J., and Grimley-Evans, J.:
Vasopressin in amnesia.
Lancet II, 608, 1978.
- 61 Gold, P.W., Weingartner, J.C., Ballenger, F.K., et al.:
Effects of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin on behavior and cognition in primary affective disorder.
Lancet II, 992, 1972.
- 62 Weingartner, H., Gold, P., Ballenger, J.G., Smallberg, S.A., Summers, R., Rubinow, D.R.,

- Post, R.M., and Goodwin, F.K.:
Effects of vasopressin on human memory functions.
Science 211, 601-603, 1981.
- 63 Pollard, A.D., and Brindley, D.N.:
Effects of vasopressin and corticosterone on
fatty acid metabolism and on the activities of
glycerol phosphate acyltransferase and phosphatidate
phosphohydrolase in rat hepatocytes.
Biochem. J. 217, 461-469, 1984.
- 64 Williamson, J.R., Cooper, R.H., and Hoek, J.B.:
Role of Calcium in the hormonal regulation of
Liver metabolism.
Biochim. Biophys. Acta 639, 243-295, 1981.
- 65 Exton, J.H.:
Molecular mechanism involved in α_1 -adrenergic
responses.
Mol. Cell. Endocrin. 23, 233-264, 1981.
- 66 Morgan, N.M., Shipp, C.C., and Exton, J.H.:
Studies on the mechanism of inhibition of hepa-
tic cAMP accumulation by vasopressin.
FEBS Lett. 163, 2, 277-280, 1983.
- 67 Morgan, N.G., Exton, J.H., and Blackmore, P.F.:
Modulation of the α_1 -Adrenergic Control of Hepato-
cyte Calcium Redistribution by Increase in Cyclic
AMP.
J. Biol. Chem. 258, 8, 5110-5116, 1983.
- 68 Keppens, S., and De Wulf, H.:
The nature of the hepatic receptors involved in
vasopressin-induced glycogenolysis.

Biochim. Biophys. Acta 588, 63-69, 1979.

- 69 Beck, T.R., Hassid, A., and Dunn, M.J.:
The Effect of Arginine Vasopressin and its
Analogues on the Synthesis of Prostaglandin E_2
by Rat Renal Medullary Interstitial Cells in
Culture.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 215, 15-19, 1980.
- 70 Schwartz, I.L., Scholtz, L.J., Kinne-Saffran, E.
et al.:
Target cell polarity and membrane phosphoryla-
tion in relation to the mechanism of action of
antidiuretic hormone.
Proc. Nat. Acad. Sci USA, 71, 2595-2599, 1974.
- 71 Hays, R.M., et al.:
Antidiuretic Hormone.
New England J. of Med., 295, 12, 659-665, 1976.
- 72 Taylor, A., Maffly, R., Wilson, L., et al.:
Evidence for involvement of microtubules in the
action of vasopressin.
Ann. NY Acad. Sci. 253, 723-737, 1975.
- 73 Kirschenbaum, M.A., Lowe, A.G., Trizna, W., and
Leon, L.G.:
Regulation of Vasopressin Action by Prostaglan-
dins. Evidence for prostaglandin synthesis in
the rabbit cortical collecting tubule.
J. Clin. Invest. 70, 1193-1204, 1982.
- 74 Fejes-Tóth, G., Magyar, A., and Walter, J.:
Renal response to vasopressin after inhibition

of prostaglandin synthesis.

Am. J. Physiol. 232, F416-F423, 1977.

- 75 Anderson, R.J., Berl, T., McDonald, K.M., and Schrier, R.W.:
Evidence for an in vivo antagonism between vasopressin and prostaglandin in mammalian kidney.
J. Clin. Invest. 56: 420-426, 1975.
- 76 Delanoy, R.L., Dunn, A.J., and Tinter, R.:
Behavioral responses to intracerebroventricularly administered neurohypophyseal peptides in mice.
Horm. Beh. 11, 348-362, 1978.
- 77 Sawyer, W.H., Grzonka, Z., and Manning, M.:
Neurohypophysial peptides: design of tissue-specific agonists and antagonists.
Mol. Cell. Endocrinol. 22, 117-137, 1981.
- 78 De Wied, D., Gaffori, O., van Ree, J.M., and de Jong, W.:
Central target for the behavioural effects of vasopressin neuropeptides.
Nature 308, 276-277, 1984.
- 79 Sawyer, W.H., and Manning, M.:
The development of vasopressin antagonists.
Fed. Proc. 43, 87-90, 1984.
- 80 Holub, B.J.:
Altered phospholipid metabolism in thrombin-stimulated human platelets.
Can. J. Biochem. Cell. Biol. 62, 341-351, 1983.

- 81 Mauco, G., Dangelmaier, C.A., and Smith, J.B.:
Inositol lipids, phosphatidate and diacylglycerol share stearyl-arachidonoylglycerol as a common backbone in thrombin-stimulated human platelets.
Biochem. J. 224, 933-940, 1984.
- 82 Siess, W., and Lapetina, E.G.:
Properties and distribution of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in human and horse platelets.
Biochim. Biophys. Acta 752, 329-338, 1983.
- 83 Lapetina, E.G.:
Regulation of arachidonic acid production: role of phospholipase C and A_2 .
Trends Pharmacol. Sci, 3, 115-118, 1982.
- 84 Hamberg, M., Svensson, J., Wakabayashi, T., and Samuelsson, B.:
Isolation and Structure of Two Prostaglandin Endoperoxides That Cause Platelet Aggregation.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 345-349, 1974.
- 85 Hamberg, M., Svensson, J., and Samuelsson, B.:
Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 8, 2994-2998, 1975.
- 86 Lagarde, M., Vericel, E., Guichardant, M., and Dechavanne, M.:
Inhibition of Thrombin-induced platelet arachidonic acid release by 15-Hydroperoxy-arachidonic

acid.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 99, 1398-1402, 1981.

- 87 Michell, R.H.:
 Inositol phospholipids and cell surface receptor
 function.
 Biochim. Biophys. Acta 415, 81-147, 1975.

- 88 Berridge, M.J.:
 Inositol trisphosphate and diacylglycerol as
 second messengers.
 Biochem. J. 220, 345-360, 1984.

- 89 Streb, H., Bayerdörffer, Haase, W., Irvine,
 R.F., and Schulz, I.:
 Effects of Inositol-1,4,5-Trisphosphate on Iso-
 lated subcellular Fractions of Rat Pancreas.
 J. Membrane Biol. 81, 241-253, 1984.

- 90 Kaibuchi, K., Takai, Y., Sawamura, M., Hoshijima,
 M., Fujikura, T., and Nishizuka, Y.:
 Synergistic Functions of Protein Phosphorylation
 and Calcium Mobilization in Platelet Activation.
 J. Biol. Chem. 258, 6701-6704, 1983.

- 91 Sundler, R., Düzgünes, N., and Papahadjopoulos, D.:
 Control of membrane fusion by phospholipid head
 groups. Phosphatidate/phosphatidylinositol speci-
 ficity.
 Biochim. Biophys. Acta 649, 743-750, 1981.

- 92 Shulka, S.D., and Hanahan, D.J.:
 Acetylglyceryl Ether Phosphorylcholine (AGEPC;
 Platelet-Activating Factor) - induced Stimulation
 of Rabbit Platelets: Correlation between Phospha-
 tidic Acid Level, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Uptake, and (^3H) Sero-
 tonin Secretion.
 Arch. Biochem. Biophys. 232, 458-466, 1984.

- 93 Hokin, M.R., and Hokin, L.E.:
Enzyme secretion and the incorporation of ^{32}P
into phospholipides of pancreas slices.
J. Biol. Chem. 203, 967-977, 1953.
- 94 Hokin-Neaverson, M., and Sadeghian, K.:
Separation of (^3H)inositol monophosphates and
(^3H)inositol on silica gel glass-fiber sheets.
J. Chromatogr. 120, 502-505, 1976.
- 95 Pizer, F.L., and Ballou, C.E.:
Studies on myo-Inositol Phosphates of Natural
Origin.
J. Amer. Chem. Soc. 85, 915-921, 1958.
- 96 Dawson, R.M.C., and Clarke, N.:
D-myo Inositol 1: 2-Cyclic Phosphate 2-Phospho-
hydrolase.
Biochem. J. 127, 113-118, 1972.
- 97 Grado, C., and Ballou, C.E.:
Myo-inositol phosphates obtained by alkaline
hydrolysis of beef brain phosphoinositide.
J. Biol. Chem. 236, 54-60, 1961.
- 98 Desjobert, A., and Petek, F.:
Chromatographie sur papier des esters phos-
phoriques de l'inositol. Application à l'étude
de la dégradation hydrolytique de l'inositol-
hexaphosphate.
Bull. Soc. Chim. Biol. 38, 871-883, 1956.

- 99 Billah, M.M., and Lapetina, E.G.:
Rapid Decrease of Phosphatidylinositol 4,5-Bis-
phosphate in Thrombin-stimulated Platelets.
J. Biol. Chem. 257, 12705-12708, 1982.
- 100 Downes, C.P., and Michell, R.H.:
The polyphosphoinositide phosphodiesterase of
erythrocyte membranes.
Biochem. J. 198, 133-140, 1981.
- 101 Binder, H., Weber, P.C., and Siess, W.:
Separation of Inositol Phosphates and Glycero-
phosphoinositol Phosphates by High Performance
Liquid Chromatography.
Anal. Biochem. 148, 220-227, 1985.
- 102 Siess, W., and Binder, H.:
Thrombin induces the rapid formation of ino-
sitol bisphosphate and inositol trisphosphate in
human platelets.
FEBS Lett. 180, 1, 107-111, 1985.
- 103 Jolles, J., Schrama, L.H., and Gipsen, W.H.:
Calcium-dependent turnover of brain polyphospho-
inositides in vitro after prelabelling in vivo.
Biochim. Biophys. Acta 666, 90-98, 1981.
- 104 Rittenhouse, S.E.:
Activation of human platelet phospholipase C
by ionophore A23187 is totally dependent upon
cyclo-oxygenase products and ADP.
Biochem J. 222, 103-110, 1984.

- 105 Watson, S.P., McConnell, R.T., and Lapetina, E.G.:
The rapid formation of inositol phosphates in human platelets by thrombin is inhibited by prostacyclin.
J. Biol. Chem. 259, 13199-13203, 1984.
- 106 Storey, D.J., Shears, S.B., Kirk, C.J., and Michell, R.H.:
Stepwise enzymatic dephosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate to inositol in liver.
Nature 312, 374-376, 1984.

DANKSAGUNG

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in den nephrologischen- und Prostaglandin-Labors (Prof. Weber) der Medizinischen Klinik Innenstadt durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Dr. Siess für die Themenstellung und seine jederzeit geduldige Beantwortung der auftretenden Fragen recht herzlich bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Barbara Boehlig für ihre Unterstützung beim experimentellen Teil.

Nicht zuletzt sei Frau Nirschel gedankt, die sich während der ganzen Zeit um mein leibliches Wohl kümmerte, sowie allen übrigen, die mir beim Zustandekommen dieser Arbeit behilflich waren.

L E B E N S L A U F

Name: Marianne Stifel

Geburtsdatum: 18.12.1952 in Bisingen

Schulbildung: Von 1959 bis 1963:
Kath. Volksschule Bisingen
Von 1963 bis 1971:
Staatl. Gymnasium Hechingen

Studium: Studium der Humanmedizin an der
Universität Tübingen von 1971 - 1979.
Ausbildung im Praktischen Jahr:
Innere Medizin und Chirurgie im
Kreiskrankenhaus Reutlingen
Wahlfach: Kinder- und Jugendpsychiatrie
an der Universität Tübingen

Berufspraxis: Vom 16.8.1979 - 16.2.1980:
Assistenzärztin in der Privatklinik
Dr. Riefler

Vom 26.5.1980 - 7.7.1981:
Assistenzärztin in der Psychosomatischen
Klinik Windach am Ammersee

Von August 1981 - Frühjahr 1983:
Freie Mitarbeiterin des Gesundheits-
parks München, Leitung von Psycho-
somatikergruppen

Seit Oktober 1981 an der Akademie für
Psychoanalyse und Psychotherapie einge-
schrieben.

Von April 1982 - Juli 1983:
Assistenzärztin im Blutspendedienst
des BRK.

Von September 1983 - April 1984:
Praxisassistentin in der gynäkologischen
Praxis Dr. Armbruster-Mayer, in München.

Von April 1984 bis September 1985:
Promotion an der Medizinischen Klinik,
Ziemssenstraße, München.

Von Februar 1985 - Oktober 1985:
Assistenzärztin in der Rehaklinik
Bad Wiessee/Tegernsee.

